

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI EHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUEYOSHI, Tokyo, MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

Reprinted by

TOA BOOK EXPORTS, INC.

Tokyo Kosho Kaikan Building
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo
CABLE: Toaperiodical, Tokyo
PHONE: Tokyo 291-1448

DIE GLYKOGENIE DER LEBER UNTER EINFLUSS VON ADENYLSÄURE, CHOLSÄURE UND SEKUNDÄREM PHOSPHAT.

VON

KAICHIRO WATANABE.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 20. Oktober 1934)

Seit Harden u. Young (1905) und Embden, Griesbach u. Schmitz (1914) ist allgemein bekannt, dass bei biologischem Zuckerabbau in Hefegärung sowie im Muskel ein Phosphat eine grosse Rolle spielt, und weiter wurde durch die Untersuchungen von Brugsch u. Horster (1925) bestätigt, dass sich das Phosphat auch an der Glykogenie der Leber beteiligt.

Neuerdings hat Fuzita (1930) bewiesen, dass das sekundäre Phosphat die Glykogenie der Leber aus Zucker fördert und diese Förderung durch Zufuhr von Cholsäure weiter verstärkt wird. Dabei hat er darauf hingewiesen, dass die Glykogenie der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure zum Teil der durch den geförderten Nukleinstoffwechsel bedingten Vermehrung der Phosphationen zuzuschreiben sei, was auch durch den Versuch von Yuuki (1932) bewiesen wurde, welcher zeigte, dass die alimentäre Hyperglykämie der Vena hepatica durch Zufuhr von sekundären Phosphat herabgesetzt wird.

Es stimmt mit dem Ergebnis von Magenta u. Biasotti (1925) und Elias u. Weiss (1922) überein, dass das sekundäre Phosphat eine hypoglykämische Wirkung hat.

Nach Uraki (1931) soll die Phosphorylierung des Zuckers in der Leber durch Gallensäure gefördert werden, worauf die Glykogenie der Leber fördernde Wirkung der Gallensäure zum Teil beruhen soll.

Ich habe schon (1932) berichtet, dass die Glykogenbildung der Leber durch Zufuhr von Adenylsäure gefördert und diese

Förderung durch Mitzufuhr von Cholsäure weiter verstärkt wird. Dies habe ich dem durch Gallensäure gesteigerten Nukleinstoffwechsel zugeschrieben, durch welchen die die Glykogenie der Leber fördernde Adenylsäure bereitet und das Phosphat, bzw. das sekundäre Phosphat, vermehrt wird.

Um diese meine Annahme zu bestätigen, habe ich die Glykogenie der Kaninchenleber unter Einfluss von Adenylsäure und sekundärem Phosphat untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Adenylsäure wurde nach Embden u. Laquer (1914/15) aus Kaninchenmuskel als Bariumsalz isoliert. Sie schmilzt bei 194°C.

Kräftige, wenigstens eine Woche lang mit einer bestimmten Menge von Okara gefütterte männliche Kaninchen wurden in 3 Gruppen geteilt und 4 Tage lang in Hunger gehalten. Den Kaninchen der ersten Gruppe wurden 10 ccm einer 30%igen Glukoselösung und 10 ccm einer 1%igen sekundären Natriumphosphatlösung pro Kilo per os verabreicht. Den Tieren der zweiten Gruppe wurde ausserdem nach einer Stunde 0,2 g Adenylsäure als möglichst wenig wässrige Natriumsalzlösung pro Kilo subkutan gegeben. Denen der dritten Gruppe wurden ausserdem mit Zucker, Phosphat und Adenylsäure gleichzeitig 10 ccm einer 3%igen Na-Cholatlösung pro Kilo per os zugeführt.

Alle diese Kaninchen wurden 4 Stunden nach der Zuckerzufuhr durch Nackenschlag und Verblutung getötet und der Glykogengehalt der schnell herausgeholtten Leber nach Iwasaki u. Moori (1926) und nach Bertrand bestimmt.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I–III zusammengestellt.

ERGEBNISSE.

Aus den Tabellen lässt sich ersehen, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von sekundärem Phosphat durchschnittlich 2,1478%, bei Mitzufuhr von Adenylsäure 2,6147% und bei Mitzufuhr von Adenylsäure u. Cholsäure 3,1317% beträgt.

TABELLE I.

Versuch bei Zufuhr von Glukose und sek. Na-Phosphat.

Datum (1933)	Körpergewicht (g)		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung.
	Hunger				
	vor	nach			
9/XII	2630	2210	39,5	2,2461	Glukose 3 g u. Na ₂ HPO ₄ 0,1g pro Kg.
10/XII	2050	1660	32,6	2,6904	
10/XII	2300	1920	37,8	2,2186	
10/XII	2620	2310	27,3	1,6226	
13/XII	2620	2150	43,7	1,8152	
13/XII	2100	1850	32,0	2,6206	
14/XII	2680	2240	48,9	1,8214	
Durchschnittswert				2,1478	

TABELLE II.

Versuch bei Zufuhr von Glukose und sek. Na-Phosphat mit Adenylsäure.

Datum (1933)	Körpergewicht (g)		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung.
	Hunger				
	vor	nach			
9/XII	2320	1970	36,0	2,7013	Glukose 3 g u. Na ₂ HPO ₄ 0,1 g u. Adenylsäure 0,2 g pro Kg.
	2340	1940	37,1	2,3914	
10/XII	2500	2210	51,5	3,2695	
	2350	1920	34,4	2,4379	
13/XII	1950	1600	35,3	2,6952	
	1970	1730	42,3	2,3943	
14/XII	2170	1970	42,9	2,4134	
Durchschnittswert				2,6147	

TABELLE III.

Versuch bei Zufuhr von Glukose und sek. Na-Phosphat mit
Adenylsäure und Cholsäure.

Datum (1933)	Körpergewicht (g)		Leber in g	Glykogengehalt in Leber in %	Bemerkung.
	Hunger				
	vor	nach			
16/XII	2120	1830	36,4	3,1050	Glukose 3 g, Na ₂ PO ₄ 0,1 g, Adenylsäure 0,2 g u. Cholsäure 0,3 g pro Kg.
„	2040	1610	34,3	3,2182	
17/XII	2120	1960	41,6	2,7256	
„	1990	1770	35,1	3,7159	
19/XII	1960	1720	45,6	3,0205	
„	2520	2280	44,2	2,8406	
20/XII	2000	1830	42,5	3,2960	
Durchschnittswert				3,1317	

Die Glykogenbildung der Leber aus Glukose bei Zufuhr von sekundärem Phosphat wird also durch Mitzufuhr von Adenylsäure um 21,7% gesteigert, durch weitere Mitzufuhr von Adenylsäure u. Cholsäure im Vergleich zu der bei Zufuhr von Phosphat allein um 45,8% und verglichen mit der bei Zufuhr von Phosphat u. Adenylsäure um 19,8% vermehrt.

Die die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung des sekundären Natriumphosphates wird durch Zufuhr von Adenylsäure gesteigert und diese Steigerung durch Mitzufuhr von Cholsäure weiter verstärkt.

Die die Glykogenie der Leber fördernde Wirkung der Adenylsäure beruht also wenigstens zum Teil auf der durch Nukleotidase bewirkten, von der Adenylsäure herrührenden Vermehrung der Phosphationen in der Leber.

Es dürfte nämlich die die Glykogenie der Leber aus Glukose fördernde Wirkung der Gallensäure auf die durch den gesteigerten Nukleinstoffwechsel bedingten Vermehrung der Phosphationen in der Leber zurückgeführt werden können.

Ob dieses Phosphation durch die Phosphorylierung des Zuckers oder durch die vermehrten Alkaliionen für die gesteigerte Glykogenbildung frei wird, ist noch eine offene Frage. Nach der Behauptung von Fuzita (1931) soll es aber auf der durch den gesteigerten Nukleinstoffwechsel verursachten Vermehrung der Alkaliionen beruhen, wofür auch das durch Zufuhr von Cholsäure gesteigerte PH u. Reservealkali der Galle und das dadurch vermehrte Reservealkali im Blut sprechen, was von Itoo (1930/31) bewiesen wurde.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die die Glykogenie der Leber aus Glukose fördernde Wirkung des sekundären Natriumphosphates wird durch parenterale Zufuhr von Adenylsäure gesteigert.

2. Diese durch Adenylsäure gesteigerte Glykogenbildung der Leber wird durch perorale Zufuhr von Cholsäure weiter verstärkt.

LITERATUR.

- Brugsch, Th. u. Horsters, H. (1925): Bioch. Zschr., **155**, 459.
Embden, G., Griesbach, W. u. Schmitz, E. (1914): Zschr. Physiol. Chem., **93**, 1.
Embden, G. u. Laquer, E. (1914/15): Zschr. f. Physiol. Chem., **93**, 116.
Elias u. Weiss (1922): Wiener Arch. f. klin. Med., **4**, 29.
Fuzita, S. (1931): Jl. of Bioch., **13**, 219.
Harden, A. u. Young W. G. (1905): Proc. Chem. Soc. London, **21**, 189.
Iwasaki, K. u. Moori, M. (1926): Prax. d. Physiol. Chem. Kursus Aufl, **11**, 334.
Itou, T. (1930/31): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 103. u. 572.
Magenta, M. A. u. Biasotti, A. (1925): Erg. d. Physiol., **23** (II), 150.
Uraki, Z. (1931): Jl. of Bioch., **14**, 123.
Watanabe, K. (1932): Bioch. Zschr., **255**, 155.
Yuuki, H. (1932): Jl. of Bioch., **15**, 359.

EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG DER ADENYLSÄURE (ADENYLPYROPHOSPHORSÄUREBILDUNG) IN DER LEBER UND IM MUSKEL.

VON

KAICHIRO WATANABE.

*(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut, Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 20. Oktober 1934)

In der ersten Mitteilung (1932) habe ich berichtet, dass die Glykogenbildung der Leber durch Zufuhr von Adenylsäure aus dem Muskel gesteigert und diese Steigerung durch Mitzufuhr von Gallensäure weiter verstärkt wird, während die Glykogenie im Muskel durch Zufuhr von Adenylsäure ohne oder mit Gallensäure herabgesetzt wird. Dabei habe ich auf Grund dieses Ergebnisses darauf hingewiesen, dass die die Glykogenie der Leber steigernde Wirkung der Gallensäure der durch die Gallensäurewirkung verursachten Vermehrung der Nukleinsäure, bzw. der Adenylsäure, zuzuschreiben sei. Was die den Nukleinstoffwechsel u. die Nukleinspaltung fördernde Wirkung der Gallensäure anbetrifft, so wurde sie schon von vielen Autoren wie Karasawa (1926/27), Hatakeyama (1927), Tanaka (1933), Okamura (1929, 1930) und Kuramoto (1932) bewiesen.

In der zweiten Mitteilung habe ich (1934) weiter berichtet, dass durch Zufuhr von Adenylpyrophosphorsäure aus dem Muskel die Glykogenbildung der Leber sowie des Muskels herabgesetzt, dagegen die Milchsäurebildung derselben gesteigert wird, während durch Mitzufuhr von Gallensäure diese herabgesetzte Glykogenie im Gegenteil gesteigert und diese vermehrte Milchsäurebildung wieder vermindert wird. Auf Grund dieser Daten habe ich meine Ansicht dahin ausgesprochen, dass die durch die Gallensäurewirkung vermehrte Adenylsäure im Muskel unter Einfluss der Gallensäure phosphoryliert wird, wobei die Adenylpyrophosphor-

säure aus Adenylsäure gebildet wird, um beim Zuckerabbau im Muskel im Sinne von Lohmann (1931) als Coferment wirken zu können.

Es muss nämlich die Gallensäure die Phosphorylierung der Adenylsäure im Muskel sowie in der Leber, bes. im ersteren, fördern und die für die Phosphorylierung der Adenylsäure notwendige Phosphorsäure zum Teil durch die die Nuklease der Leber und des Muskels fördernde Wirkung der Gallensäure aus Nukleinsäure befreit werden. Durch die Wirkung der Gallensäure muss also die Adenylsäure und die Adenylpyrophosphorsäure, wie Lohmann (1934) behauptet, je nach Bedarf ineinander übergehen.

Bei der Vermehrung der Adenylsäure geht also die Glykogenie vor sich, während bei der Vermehrung der Adenylpyrophosphorsäure, bzw. bei der Verminderung der Adenylsäure die Glykolyse gefördert wird. In der Leber findet bekanntlich eine lebhafte Glykogenbildung statt, während im Muskel hauptsächlich die Glykolyse von statten geht. Somit dürfte die Adenylsäurebildung in der Leber herrschen, dagegen im Muskel hauptsächlich die Adenylpyrophosphorsäurebildung stattfinden, da ja im Muskel mehr als in der Leber Pyrophosphatase vorkommt, deren Wirkung durch Gallensäure gefördert werden dürfte.

In obenerwähntem Sinne habe ich den Einfluss der Gallensäure auf die Phosphorylierung der Adenylsäure in der Leber und im Muskel untersucht, um die physiologische Wirkung der Nukleinsäure und der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel klarzustellen.

Seit Neuberg u. Wagner (1926) ist allgemein bekannt, dass Pyrophosphatase im Organ und Gewebe vorkommt, wie sie auch Kurata (1931) in der Leber und der Niere vom Schwein gefunden hat. Weiter wurde sie von Engelhardt (1930) im Erythrocyten und von Embden, Hefter u. Lehnartz (1930) im Muskel beobachtet, und nach diesen Autoren soll die Pyrophosphorsäure im Muskel wieder in aerobem Zustand synthetisiert werden. Nach Lehnartz (1929) wird die Adenylsäure im Muskel fermentativ unter Phosphorylierung in Adenylpyrophosphorsäure umgewandelt

und die sogenannte Pyrophosphatfraktion nach Lohmann (1928) dort vermehrt; diese soll nach Meyerhof, Lohmann u. Meyer (1931) bei der Glykolyse als Coferment wirken.

Die Adenylpyrophosphatase kommt nach Jacobson (1931) und Barrenschéen u. Lang (1932) nicht nur im Muskel, sondern auch in der Leber vor, sie hat nach den letzten Autoren ihre spezifische Wirkung auf Adenylpyrophosphorsäure und ihr PH-Optimum bei 8,2 u. 9,0.

Die Nukleotidase im Organ und Gewebe ist bekanntlich eine Phosphatase, die, wie Okamura (1930) u. Kuramoto (1932) bewiesen haben, durch Gallensäure gefördert wird. Was die Wirkung der Gallensäure auf Phosphatase und Phosphatase betrifft, so wurde von Uraki (1931) und Takata (1931) gefunden, dass die Spaltung der Zuckerphosphorsäure und der Glycerinphosphorsäure im Leber- sowie Muskelextrakt durch Gallensäure gehemmt, aber ihre Synthese durch diese gefördert wird.

Somit dürfte die Synthese der Adenylpyrophosphorsäure durch Gallensäure eine Förderung erfahren, welche mehr im Muskel als in der Leber vor sich gehen kann.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Adenylsäure wurde nach Embden u. Laquer (1914/15) aus Muskelpressaft von Kaninchen bereitet; zum Versuch wurde mehrmals umkrystallisierte Säure von Fp 194°C verwendet.

Die Fermentlösung wurde in folgender Weise zubereitet. Eine bestimmte Menge von schnell herausgeholter Leber und ebensolchem Muskel wurde nach möglichster Entfernung der Fette und Sehnen im Mörser mit Seesand gut verrieben, mit 5 facher Menge Wasser gut durchgerührt und unter Chloroform u. Toluol 48 Stunden lang im Brutschrank bei 37°C digeriert. Dieses Autolysat wurde weiter 24 Stunden lang unter Zusatz einiger Tropfen Eisessig im Brutschrank stehen gelassen und filtriert. Dieses Filtrat wurde 48 Stunden lang in Leitungswasser dialysiert. Dieses Dialysat wurde als Fermentlösung gebraucht.

Als Puffer wurde das Sörensensche Phosphatgemisch von PH 7,73 gebraucht und als Gallensäure 1%ige Na-Cholatlösung

verwendet, während sie in der Versuchslösung 0,1% enthält. Das Experiment wurde in der folgenden Versuchsanordnung ausgeführt und das Gemisch im Brutschrank 48 Stunden lang bei 37°C stehen gelassen.

TABELLE I.

Nr. d. Kölbchens ccm v. Zusätze	Leber			Muskel		
	1	2	3	1	2	3
Fermentlös.	20	20	20	20	20	20
2% Adenylsäurelös.	5	5	—	5	5	—
Phosphatgemisch	20	20	20	20	20	20
1% Na-Cholatlös.	5	—	—	5	—	—
Wasser	—	5	10	—	5	10

Dieser Versuch hat eigentlich den Zweck, die Phosphorylierung der Adenylsäure zu beobachten, die Spaltung der dadurch entstandenen Adenylpyrophosphorsäure wird nach Barrenscheen u. Lang (1932) durch anorganisches Phosphat beträchtlich gehemmt. Daher wurde hierbei als Puffer das Sörensensche Phosphatgemisch gebraucht.

Das Reaktionsgemisch wurde erst nach Schenck enteiweissst und das anorganische Phosphat nach Embden (1932) gravimetrisch bestimmt.

Wenn die Phosphatmenge des Kölbchens Nr. 3 aus der des Kölbchens Nr. 1 oder 2 reduziert wird, so erhält man die aus Adenylsäure gespaltene Phosphatmenge, deren Prozentgehalt zu der aus der Adenylsäure 0,1 g berechneten Phosphatmenge errechnet wurde.

Auf diese Weise wurde der Prozentgehalt des Kölbchens Nr. 1 und 2 miteinander verglichen, um den Einfluss der Cholsäure auf die Phosphorylierung der Adenylsäure zu beobachten.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen II u. III zusammengestellt.

Aus den Tabellen II u. III lässt sich ersehen, dass die freigebliebene Phosphatmenge beim Leberferment bei Abwesenheit von

Phosphorylierung d. Adenylsäure in d. Leber u. im Muskel. 207

TABELLE II.
Gefunden Phosphorsäuremenge (mg)

Nr. d. Versuches	Nr. d. Kõlbehens	Leber			Muskel		
		1	2	3	1	2	3
1		38,5065	38,4930	34,9800	37,1670	38,4290	36,0720
2		38,3220	38,5675	34,9470	37,2315	38,4930	36,0885
3		38,7930	39,3135	35,0475	37,0965	38,4060	36,0210
4		38,2725	39,0450	34,9305	37,1805	38,4570	36,0720
5		38,8770	39,0105	35,0540	36,9130	38,2380	35,9880
6		38,7930	38,7750	35,0310	37,1130	38,3730	36,0045

TABELLE III.
Frei gebliebene Phosphorsäuremenge.

Nr. d. Versuches	Leber				Muskel			
	Cholsäure							
	mit		ohne		mit		ohne	
	mg	mg%	mg	mg%	mg	mg%	mg	mg%
1	3,5265	41,6251	3,5130	41,4787	1,1230	13,2557	2,3670	27,9397
2	3,3750	39,8392	3,6205	42,7359	1,1430	13,4918	2,4045	28,3823
3	3,7450	42,4016	4,2680	50,3789	1,0755	12,6950	2,3850	28,1522
4	3,3420	39,4485	4,1145	48,5670	1,1085	13,0845	2,3850	28,1522
5	3,8230	45,1264	3,9565	44,7017	0,9240	10,9067	2,2500	26,5587
6	3,7620	44,4061	3,7440	44,1936	1,1085	13,0845	2,3685	27,9574
Durch- schnitts wert	3,5955	42,1411	3,7027	45,6759	1,0804	12,7530	2,3600	27,8571

Cholsäure durchschnittlich 3,7027 mg beträgt und, berechnet aus der Phosphorsäuremenge der zugesetzten Adenylsäure, 45,6759% ausmacht, während sie bei Zusatz von Cholsäure durchschnittlich 3,5955 mg beträgt und, berechnet aus der Phosphorsäuremenge der zugesetzten Adenylsäure, 42,1411% ausmacht.

Beim Versuch mit Muskelferment beträgt die freigebliebene

Phosphatmenge ohne Zusatz von Cholsäure durchschnittlich 2,36 mg und macht, berechnet aus der Phosphorsäuremenge der zugesetzten Adenylsäure, 27,8571% aus, während sie bei Zusatz von Cholsäure durchschnittlich 1,084 mg beträgt und, berechnet aus der Phosphorsäuremenge der zugesetzten Adenylsäure, 12,753% ausmacht.

Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass die Phosphorsäurespaltung aus Adenylsäure beim Leberferment viel stärker auftritt als beim Muskelferment, was mit dem Ergebnis von Juschtschenko (1911) übereinstimmt. Durch die Untersuchungen von Okamura (1930) und Kuramoto (1932) ist klar geworden, dass die Wirkung der Nukleotidase in Leber und Darm durch Gallensäure gefördert wird. Bei diesem Versuch ist die aus Adenylsäure durch Lebernukleotidase sowie Muskelnukleotidase freigewordene Phosphorsäuremenge durch Zusatz von Cholsäure beträchtlich vermindert.

Dies beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass die durch Nukleotidase aus Adenylsäure abgespaltene Phosphorsäure wieder mit der zurückgebliebenen Adenylsäure Adenylpyrophosphorsäure gebildet hat, wie es bei Hexosephosphorsäuresynthese nach Uraki (1931) und bei Glycerinphosphorsäuresynthese nach Takata (1931) der Fall war.

Diese Adenylpyrophosphorsäuresynthese tritt also, wie aus den Tabellen II u. III ersichtlich ist, im Muskel viel stärker auf als in der Leber.

Auf Grund dieser Daten kann der Schluss gezogen werden, dass die Adenylsäure im Kohlehydratstoffwechsel gegen die Adenylpyrophosphorsäure antagonistisch wirkt, indem die erste die Glykogenie im Muskel sowie in der Leber, bes. in der letzteren, und die zweite die Glykogenolyse und Glykolyse in beiden, bes. im Muskel, fördert.

Diese Umkehrung von Adenylsäure und Adenylpyrophosphorsäure im Muskel und in der Leber, bes. in der letzteren, wird durch Gallensäure reguliert, indem die Gallensäure sie in der Leber nach der Richtung der Adenylsäuresynthese und im Muskel nach der der Adenylpyrophosphorsäuresynthese verschiebt.

Die die Glykogenie der Leber fördernde Wirkung der Gallensäure hängt also wesentlich von der Bildung der Nukleinsäure, bzw. der Adenylsäure ab, welche durch die Gallensäurewirkung reguliert wird.

Die Regulation des Kohlehydratstoffwechsels durch Gallensäure im Organismus steht also mit ihrer den Nukleinstoffwechsel fördernden Wirkung in innigem Zusammenhang.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Phosphorylierung der Adenylsäure findet sowohl im Muskel als auch in der Leber statt.

2. Diese Phosphorylierung wird durch Cholsäure gefördert, und diese Förderung tritt viel stärker im Muskel auf als in der Leber.

LITERATUR.

- Barrenscheen, H. K. u. Lang, S. (1932): *Bioch. Z.*, **253**, 395.
 Engelhardt, W. A. (1930): *Bioch. Z.*, **227**, 16.
 Embden, G., Hefter, J. u. Lehnartz, M. (1930): *Z. f. Physiol. Chem.*, **187**, 53.
 Embden, G. u. Laquer, E. (1914/15): *Z. f. Physiol. Chem.*, **93**, 116.
 Hatakeyama, T. (1927): *Jl. of Bioch.*, **8**, 261.
 Jacobson, E. (1931): *Bioch. Z.*, **242**, 292.
 Juschtschenko, A. I. (1911): *Bioch. Z.*, **31**, 277.
 Karasawa, R. (1926/27): *Jl. of Bioch.*, **6**, 139 u. **7**, 145.
 Kuramoto, T. (1932): *Jl. of Bioch.*, **16**, 141.
 Kurata, K. (1931/32): *Jl. of Bioch.*, **14**, 25.
 Lohmann, K. (1934): *Naturw.*, **22**, 409.
 Lohmann, K. (1931): *Bioch. Z.*, **241**, 50 u. **67**, u. **237**, 445.
 Lehnartz, M. (1929): *Z. f. Physiol. Chem.*, **184**, 1.
 Lohmann, K. (1928): *Bioch. Z.*, **203**, 172.
 Meyerhof, O., Lohmann, K. u. Meyer, K. (1931): *Bioch. Z.*, **237**, 437.
 Neuberg, K. u. Wagner, J. (1926): *Bioch. Z.*, **171**, 485.
 Okamura, T. (1930): *Arb. Med. Univ. Okayama*, **2**, 246.
 Okamura, T. (1928): *Jl. of Bioch.*, **8**, 391.
 Tanaka, K. (1933): *Jl. of Bioch.*, **17**, 111.
 Takata, H. (1931): *Jl. of Bioch.*, **14**, 61 u. 439.
 Uraki, Z. (1931): *Jl. of Bioch.*, **14**, 123.
 Watanabe, K. (1932): *Bioch. Z.*, **255**, 155.
 Watanabe, K. (1934): *Bioch. Z.*, **274**, 268.

VORKOMMEN DES TAUROCHOLATES IN DER SCHLANGEN- UND KATZENGALLE.

VON

MASATA IWATO UND KAICHIRO WATANABE.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 20. Oktober 1934)

Um die Beziehung zwischen der Gallensäurebildung und den Nahrungsbestandteilen festzustellen, ist schon seit Jahren Galle der verschiedensten Tiere von vielen Autoren untersucht worden, und man hat gefunden, dass in der Galle des Fleischfressers, z. B. des Hundes Hammarsten (1904), der Löwen K. Tanaka (1932) und in der einer grossen Anzahl von Fischarten hauptsächlich Taurocholat enthalten ist. Die Eigenschaften des Taurocholates hat T. Tanaka (1933) neuerdings genau untersucht.

Wir haben nun die Gallensäure von Schlangen und Katzen, die beide Fleischarten als Nahrung aufnehmen, untersucht und gefunden, dass sie hauptsächlich Taurocholat enthält.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

a. *Taurocholat aus Schlangengalle.*

400 Schlangen, *Elaphe quadrivirgata* (Roie), wurden getötet und ihre Gallenblasen herausgenommen. Die Blasen wurden dann getrocknet, ihre Trockensubstanz betrug ca. 75 g.

Diese wurde mit absolutem Alkohol gut extrahiert, die Alkohol-lösung abgedampft und der Rückstand in Wasser gelöst. Aus dieser Lösung wurden nach Tanaka (1933) 17,5 g Taurocholat erhalten.

Das Salz wurde noch mehrmals aus verdünntem Alkohol und Äther umkrystallisiert. Dieses Taurocholat schmilzt bei 180°C.

3,122 mg Substanz: 0.08 ccm N (28°, 767,5 mm).

3,091 mg Substanz: 0.08 ccm N (28°, 767,5 mm).



Ber. N 2,60% Gef. N 2,77%, 2,80%.

Spezifische Drehung: 0,112 g Subst., 10 ccm Wasser, 2 dm,

$$\alpha = +0,53; [\alpha]_D^{20} = +23,66$$

Aus 1 g Taurocholat wurde durch Verseifung mit Kalilauge eine Cholsäure erhalten, die bei 198°C schmilzt und $[\alpha]_D^{20} = +37$ zeigt.

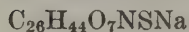
Sie gibt die Hammarstensehe und Myliusche Reaktion. Aus dem Hydrolysat wurde nach Salkowski Taurin isoliert, dessen Schmelzpunkt bei 298°C liegt. Aus dem Eisenniederschlag wurde keine andere Gallensäure erhalten.

b. Taurocholat aus Katzensgalle.

Ca. 80 ccm Gallen wurden nach Befreiung von Mucin durch Alkohol nach Tanaka verarbeitet; das Taurocholat wurde in krystallinischer Form erhalten. Die Ausbeute betrug 3,6 g. Der Krystall schmilzt bei 180°C und gibt die Hammarstensehe Reaktion.

3,208 mg Substanz: 0,088 ccm N (30°, 960 mm).

2,365 mg Substanz: 0,062 ccm N (30°, 764 mm).



Ber. N 2,60% Gef. N 2,90%, 2,78%.

Der Krystall ergab bei der Hydrolyse Cholsäure und Taurin, von denen die erstere bei 198°C, die letztere bei 298°C schmilzt.

Aus dem Eisenniederschlag konnte wegen des spärlichen Materials leider keine Gallensäure erhalten werden.

LITERATUR.

Hammarsten, O. (1904): *Z. f. Physiol. Chem.*, **43**, 127.

Tanaka, K. (1932): *ebenda* **213**, 199.

Tanaka, T. (1933): *ebenda* **220**, 39.

EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DIE AMMONIAKAUSFUHR IM HARN.

VON

YUTAKA KAWADA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut, Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 20. Oktober 1934)

Die Gesamtbilanz der Säuren und Alkalien ist von entscheidendem Einfluss auf die Grösse der Ammoniakausscheidung. Die im Organismus zirkulierenden Säuren vermehren bekanntlich die Ausfuhr von Ammoniak, welches als ein Neutralisationsmittel und somit als eine entgiftende Substanz wirken soll, wie zuerst von Walter (1872) am Hunde klar erkannt worden ist. Die Zufuhr von Alkalien setzt andererseits bekanntlich sowohl die normale wie namentlich die gesteigerte Ammoniakausscheidung herab, wie schon früher von Salkowski u. Munk (1877) u. Haskins (1906) bewiesen wurde.

Nach der Untersuchung von Itoo (1931) u. Kuramoto (1934) soll die Alkalireserve des Blutes beim Hunde durch Zufuhr von Cholsäure vermehrt und das PH des Harns sogar dadurch gesteigert werden.

Infolgedessen muss die Ammoniakausfuhr im Harn durch Zufuhr von Cholsäure vermindert werden.

Andererseits ist nach Loeb (1924) u. Nasch u. Benedict (1921) die Niere ein Organ der Ammoniakbildung, und nach der neuesten Untersuchung von Krebs (1932/33) soll dieses Harn-ammoniak aus Aminosäuren oder Nukleinsäure in der Niere durch Desaminierung gebildet und unter Austausch der Alkalien mit dem gebildeten Ammoniak als Ammoniumsalz im Harn ausgeschieden werden, was das Gleichgewicht der Bilanz von Säuren und Alkalien zur Folge hat.

Nach Krebs soll eine Acidosis stattfinden, wenn das Harn-ammoniak durch verringerte Desaminierung in der Niere her-

abgesetzt und somit die Alkalireserve im Blut verringert wird.

Die Nukleinsäurespaltung, die in der Niere eine Quelle von Harnammoniak darstellt, wird aber durch Zufuhr von Cholsäure gefördert, wie von Karasawa (1926/27), Hatakeyama (1927), Kaziro (1927), Kobayashi (1928), Sekitoo (1929) und Okamura (1930) bewiesen wurde.

Wenn das Harnammoniak hauptsächlich aus Nukleinsäure in der Niere geliefert wird, so sollte das Ammoniak im Harn durch Zufuhr von Gallensäure vermehrt werden, aber nach Krebs (1932/33) soll es in den Aminosäuren zu suchen sein. Betreffs des Einflusses der Gallensäure auf den Eiweisstoffwechsel wurde schon von Karasawa (1926) und Kaziro (1927) bewiesen, dass er durch Zufuhr von Gallensäure herabgesetzt wird.

Somit muss das Harnammoniak durch Zufuhr von Gallensäure verringert werden. In obenerwähntem Sinne habe ich die Ammoniakausscheidung im Harn unter Zufuhr von Cholsäure untersucht, um klarzustellen, ob die durch Zufuhr von Cholsäure bedingte starke alkalische Reaktion des Harns auch auf Ammoniak beruhen könnte.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden kräftige Hündinnen verwendet, die vor und während der Versuche immer mit einer bestimmten Nahrung gefüttert wurden. Der Versuch wurde in drei Perioden: Vor-, Nach- und Versuchsperiode geteilt; in der Versuchsperiode wurde vor der Katheterisierung 1 g Cholsäure pro Tier, eingeschlossen in Brot, per os verabreicht oder 10 ccm einer 2%igen Cholatlösung pro Tier intravenös injiziert. In jeder Periode wurde der Harn von 8 Uhr morgens bis 2 Uhr nachmittags 6 Stunden lang, durch Katheterisierung stündlich oder nach je 2 Stunden gesammelt und sein Ammoniakgehalt nach der Krüger-Reichschen Methode bestimmt.

Nach der Katheterisierung des Harns wurde eine bestimmte Nahrung verabreicht, die aus Reis: 250 g, trocknem Fisch: 100 g, Gemüse: 100 g, Sojasuppe: 30 ccm und Wasser: 1000 ccm bestand. Der Ammoniakgehalt des Harns in den 3 Perioden wurde ver-

glichen, um den Einfluss der Cholsäure auf die Ammoniakabscheidung zu sehen. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I-III zusammengestellt.

1. Versuch mit intravenöser Zufuhr von Cholsäure.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, der Ammoniakgehalt des Harns bei Zufuhr von Cholsäure verglichen mit der Vorperiode prozentual nach 2 Stunden um 41,98%, nach 4 Stunden um 41,82% und nach 6 Stunden um 35,85% herabgesetzt, während er der absoluten Menge nach nach 2 Stunden um 35,85% und nach 6 Stunden um 19,8% vermindert ist.

TABELLE I (Hündin 20 Kg)
Bei intravenöser Zufuhr von Cholsäure.

Datum 1933	Harnmenge ccm	Spez. Gew.	Ammoniak	
			mg	mg%
16/XI	133	1012	60,17	44,88
	94	1014	29,04	31,96
	63	1015	20,56	32,64
17/ "	94	1013	51,78	55,08
	85	1015	31,79	37,40
	76	1015	27,39	36,04
18/ "	104	1013	33,24	31,96
	160	1012	33,82	21,76
	95	1014	21,96	23,12
19/ "	83	1014	38,94	46,92
	80	1015	35,36	44,20
	65	1016	27,85	42,84
20/ "	114	1012	51,16	44,88
	81	1013	29,74	36,72
	72	1015	26,93	37,40

Verglichen mit dem der Nachperiode ist der Ammoniakgehalt des Harns bei Zufuhr von Cholsäure sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual vermindert.

Die intravenöse Zufuhr von Cholsäure setzt also die Ammoniak-ausscheidung im Harn herab.

In diesem Fall wird das spezifische Gewicht des Harns durch Cholsäure herabgesetzt und die Harnmenge etwas vermehrt.

2. Versuch mit peroraler Zufuhr von Cholsäure.

Aus den Tabellen lässt sich ersehen, dass der Ammoniakgehalt des Harns bei Zufuhr von Cholsäure verglichen mit dem der Vorperiode prozentual nach 2 Stunden um 9,14–27,48%, nach 4 Stunden um 35,52–36,98% und nach 6 Stunden um 12,42–22,6% herabgesetzt ist, während er der absoluten Menge nach nach 2 Stunden um 27,95–30,37%, nach 4 Stunden um 16,18–36,99% und nach 6 Stunden um 5,93% vermindert ist.

TABELLE II (Hündin 20 Kg)
Bei peroraler Zufuhr von Cholsäure.

Datum 1934	Harnmenge cem	Spez. Gew.	Ammoniak	
			mg	mg%
27/I	48	1014	44,06	91,80
	50	1016	44,54	89,08
	62	1015	46,80	75,48
	40	1019	41,34	103,36
	38	1020	40,05	105,40
	25	1023	28,73	114,92
27/„	55	1013	37,77	68,68
	48	1015	31,01	64,60
	63	1014	36,84	58,48
	52	1015	34,65	66,64
	49	1016	41,14	83,96
	37	1018	37,14	100,64
28/„	40	1017	38,90	97,24
	46	1016	39,87	86,68
	54	1016	45,34	83,96
	37	1019	39,00	105,40
	33	1020	36,58	110,84
	30	1021	35,70	119,00

Einfluss der Gallensäure auf die Ammoniakausfuhr im Harn. 217

TABELLE III (Hündin 20 Kg)
Bei peroraler Zufuhr von Cholsäure.

Datum 1934	Harnmenge cem	Spez. Gew.	Ammoniak	
			mg	mg%
18/III	64	1012	45,70	71,40
	52	1015	44,37	85,32
	46	1016	44,10	95,88
	40	1018	39,71	99,28
	43	1017	40,35	93,84
	32	1019	36,12	112,88
19/ „	72	1011	46,51	64,60 ←
	41	1016	31,77	77,52
	68	1013	36,53	53,72
	40	1016	25,02	62,56
	45	1016	31,82	70,72
	38	1018	33,97	87,36
20/ „	41	1016	40,15	97,92
	50	1015	44,54	89,08
	52	1016	48,44	93,16
	37	1018	38,49	114,04
	28	1019	31,42	112,20
	25	1020	29,24	116,96

Gegenüber dem der Nachperiode ist der Ammoniakgehalt des Harns bei Zufuhr von Cholsäure sowohl absolut als auch prozentual vermindert.

Also wird durch Verfütterung der Cholsäure die Ammoniak-
ausscheidung im Harn ebenfalls herabgesetzt.

Andrerseits wird durch Verfütterung der Cholsäure das spezi-
fische Gewicht herabgesetzt und die Harnmenge dadurch etwas
vermehrte.

Diese durch Cholsäure herabgesetzte Ammoniakausscheidung
im Harn und die dadurch vermehrte Harnausscheidung tritt bei
intravenöser Zufuhr viel stärker auf als bei peroraler.

Nach Sekitoo (1929) und Hasegawa (1934) wird die Aus-
scheidung des Kalzium und Natrium im Harn durch Zufuhr von

Cholsäure vermehrt, dagegen die des Kalium und auch die des Ammoniak vermindert.

Somit scheint mir die durch Zufuhr von Cholsäure verstärkte alkalische Reaktion des Harns auf der vermehrten Ausscheidung der Erdalkalien bzw. des Kalzium und des Natrium zu beruhen.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die Ammoniakausscheidung im Harn der Hündin wird sowohl durch intravenöse als auch durch perorale Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt.

LITERATUR.

- Fuziwara, K. (1931): *Jl. of Bioch.*, **13**, 43.
Hasegawa, T. (1930): *Jl. of Bioch.*, **19**, 403.
Haskins H. D. (1906): *Jl. of Biolog. Chem.*, **2**, 216.
Hatakeyama, T. (1927): *Jl. of Bioch.*, **8**, 261.
Itou, T. (1931): *Arb. Med. Univ. Okayama*, **2**, 572.
Karasawa, R. (1926/27): *Jl. of Bioch.*, **6**, 139 u. **7**, 145.
Kaziro, K. (1927): *Jl. of Bioch.*, **7**, 293.
Kobayashi, T. (1928): *Jl. of Bioch.*, **9**, 251.
Krebs, H. A. (1932): *Klin. Wschr.*, **42**, 1744.
Krebs, H. A. (1933): *Z. Physiol. Chem.*, **217**, 191.
Krüger, M. u. Reich, O. (1903): *Z. Physiol. Chem.*, **39**, 165.
Kuramoto, T. (1934): *Jl. of Bioch.*, **19**, 245.
Loeb, R. F., Atchley, D. W. u. Benedict, E. M. (1924): *Jl. of Biolog. Chem.*, **60**, 491.
Nash, T. P. u. Benedict, S. R. (1921): *Jl. of Biolog. Chem.*, **48**, 463.
Okamura, T. (1930): *Arb. Med. Univ. Okayama*, **2**, 245.
Salkowski, E. u. Munk, J. (1877): *Virehows Arch.*, **71**, 500.
Sekitoo, T. (1929): *Jl. of Bioch.*, **11**, 251.
Walter, F. (1872): *Arch. f. exper. Path. u. Pharm.*, **7**, 148.

BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KALKSTOFF- WECHSEL. X.

Kalkausscheidung in Harn und Galle bei normalem sowie thyreoparathyreoprivem Hunde.

VON

SINSAKU TUZIOKA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 29. Oktober 1934)

Seit den Untersuchungen von Voit (1892), Rüdell (1894) u. Rey (1895) ist allgemein bekannt, dass der Kalk hauptsächlich durch den Darm ausgeschieden wird. Der Kalk wird, wie Gillert (1924) bewiesen hat, sowohl im Harn als auch in der Galle ausgeschieden, und zwar soll dies nach Gillert (1924) u. Ota (1927/28) mehr im Harn als in der Galle geschehen. Wie Zondek (1922) und Wollheim (1929) experimentell bewiesen haben, steht der Kalkstoffwechsel mit der Funktion des vegetativen Nervensystems in innigem Zusammenhang. Somit wird bekanntlich die Kalkverteilung in den Organen und Geweben durch das vegetative Nervengift sowie durch das mit der vegetativen Nervenfunktion eng verknüpfte Hormon beeinflusst. So hat Kitayama (1927) einen durch Adrenalin oder Piquüre verminderten Blutkalkgehalt bei Kaninchen beobachtet und Ota (1927/28) eine durch Adrenalin verminderte u. durch Pilokarpin vermehrte Kalkausscheidung in der Galle des Kaninchens gefunden.

Weiter wurde eine hyperkalcämische Wirkung der Gallensäure von Sekitoo (1930) beobachtet, die nach Tsuji (1930) u. Sekitoo (1930) auf den Sympathikus lähmend und auf den Vagus reizend einwirken soll. Diese mit der vegetativen Nervenfunktion eng verknüpfte Gallensäure soll nach Kawada (1930) die Kalkausscheidung in der Lebergalle, nach Sekitoo (1930) u. Fuziwaru (1931) die im Harn vermehren, während sie nach Okii (1932) u.

Kuramoto (1934) die Kalkausfuhr im Darm vermindern soll, wogegen das Adrenalin sie wieder vermehren kann.

Dieser Kalkstoffwechsel ist auch, wie seit McCallum u. Voegtlin (1909) bekannt ist, mit der Funktion der Nebenschilddrüse eng verknüpft, indem bei parathyreopriven Tetanie der Blutkalkgehalt stark vermindert wird; diese Tetanie kann aber durch Parathhormon nach Collip (1925) unter Vermehrung des Blutkalkes aufgehoben werden. Nach Greenwald (1925) u. Gross (1926) führt die Parathyreoidektomie eine Verminderung der Kalkausscheidung im Harn sowie in der Galle herbei, die durch Parathhormon unter Mobilisierung des Knochenkalkes wieder vermehrt wird.

Was den Einfluss der Gallensäure auf den Kalkstoffwechsel bei parathyreopriven Hündin betrifft, so wurde von Hosizima (1933/34) beobachtet, dass der Blutkalkgehalt sowie die Kalkausscheidung im Harn der thyreoparathyreopriven Hündin durch subkutane Zufuhr von Cholsäure vermehrt, aber der tetanische Anfall nicht aufgehoben wird, und dass andererseits die perorale Zufuhr von Cholsäure in vielen Fällen vor tetanischem Anfall schützt oder den Anfall verschiebt.

Nach ihm soll die Tetanie bei der parathyreopriven Hündin nicht nur auf der Verminderung des Blutkalkgehaltes, sondern auch auf der durch Parathyreoidektomie bedingten Störung der Leberfunktion beruhen.

Daher ist es von Bedeutung, den Einfluss der Parathyreoidektomie auf die Kalkausscheidung in der Galle und im Harn gleichzeitig zu beobachten und den Einfluss der Gallensäure auf dieselbe bei normaler sowie thyreoparathyreopriven Hündin zu erforschen, besonders weil nach Okii (1934) die Gallensäure eine entgiftende Wirkung in der Leber haben soll.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurde eine kräftige Hündin verwendet, der eine Gallenblasenfistel angelegt und die hintere Scheidewand geöffnet wurde, um den Harn leicht katheterisieren zu können. Nachdem die Hündin sich von der Operationswunde erholte hatte, wurde sie

täglich mit einer bestimmten Menge von Reis, trocknen Fischen, Gemüse u. Suppe aus Sojabohnen gefüttert.

Zuerst wurde von 8 Uhr morgens bis 2 Uhr nachmittags der Harn der Hündin durch Katheterisieren und die Galle aus der Fistel in die Glaskugel stündlich gesammelt und dann eine bestimmte Nahrung verfüttert. Ausserhalb der Zeit der Gallensammlung liess man die Hündin ruhig ihre eigene Galle aus der Fistel ablecken.

Um den Einfluss der Gallensäure auf die Kalkausscheidung im Harn und in der Galle zu sehen, wurde der Hündin um 8 Uhr morgens 1 ccm einer 1–2%igen Na-Cholatlösung pro Kilo subkutan oder 0,05 g Cholsäure pro Kilo als 10%ige Cholatlösung in Brötchen getränkt peroral verabreicht und Galle u. Harn stündlich in gleicher Weise gesammelt. Dieser Versuch wurde alle 2–3 Tage hintereinander ausgeführt, und die Kalkausscheidungen im Harn und in der Galle bei oder ohne Zufuhr von Cholsäure wurden miteinander verglichen.

Nachdem die Kalkausscheidung im Harn und in der Galle bei der die Gallenblasenfistel tragenden Hündin 3–4 Tage lang alle 2 Stunden festgestellt worden war, wurde dem Tier unter Äthernarkose die Nebenschilddrüse mit der Schilddrüse ganz entfernt. Bei dieser nun thyreoparathyreopriven Hündin wurde die Kalkausscheidung im Harn und in der Galle in gleicher Weise mit oder ohne Zufuhr von Cholsäure stündlich beobachtet. Bei diesem Versuch wurde 1 ccm einer 2%igen Na-Cholatlösung pro Kilo intravenös injiziert.

Der Kalk in der Galle wurde nach De Waard (1919) und der im Harn nach der von Inouye modifizierten Methode von De Waard (1922) bestimmt. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

ERGEBNISSE.

1. Bei normaler Gallenfistelhündin.

Wie aus Tabellen I–III ersichtlich ist, zeigt der Kalkgehalt der Galle und des Harns eine zeitliche Schwankung, der des Harns

TABELLE I A.

Hündin I. (10 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Fisch 30 g, Gemüse 80 g,
Soja-Suppe 20 cem u. Wasser 1000 cem.

Kalzium in Galle mg(cem)								
	St. Dat.	1 St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.	6 St.	Gesamt- menge
Kontrolle	1/IX	0,347 (3,0)	0,264 (4,2)	0,280 (4,0)	0,211 (3,6)	0,270 (3,8)	0,252 (3,8)	1,613 (22,4)
	14/ „	0,665 (5,2)	0,551 (5,4)	0,499 (4,0)	0,437 (4,2)	0,221 (1,8)	0,304 (2,2)	2,677 (22,8)
	Durch- schnitts wert.	0,506 (4,1)	0,408 (4,8)	0,390 (4,0)	0,324 (3,9)	0,246 (2,8)	0,278 (3,0)	2,152 (22,6)
1% Na- cholatlös. 10 cem.	10/IX	1,003 (7,8)	0,689 (5,8)	0,544 (3,6)	0,607 (3,6)	0,569 (3,0)	0,594 (3,8)	4,006 (27,6)
	16/ „	1,140 (7,4)	0,590 (3,8)	0,461 (3,6)	0,285 (2,2)	0,323 (2,4)	0,289 (3,0)	3,088 (22,4)
	Durch- schnitts wert.	1,072 (7,6)	0,640 (4,2)	0,503 (3,6)	0,446 (2,9)	0,446 (2,7)	0,442 (3,4)	3,549 (25,0)
2% Na- cholatlös. 10 cem.	30/IX	2,024 (13,6)	0,572 (4,2)	0,528 (3,2)	0,454 (3,8)	0,500 (3,2)	0,371 (2,6)	4,449 (30,6)
	12/X	1,920 (11,8)	0,543 (3,2)	0,400 (2,2)	0,359 (1,8)	0,389 (1,8)	0,431 (2,0)	4,042 (22,8)
	Durch- schnitts wert.	1,972 (12,7)	0,558 (3,7)	0,464 (2,7)	0,407 (2,8)	0,445 (2,5)	0,401 (2,3)	4,247 (26,7)
0,05 g Cholsäure pro kg per os	23/X	0,605 (5,0)	0,854 (8,0)	1,000 (8,4)	0,824 (7,0)	0,783 (7,0)	0,688 (5,6)	4,754 (41,0)
	28/ „	0,744 (5,6)	1,167 (8,0)	1,213 (8,4)	0,833 (5,6)	0,791 (5,2)	0,463 (4,1)	5,211 (36,9)
	Durch- schnitts wert.	0,675 (5,3)	1,011 (8,0)	1,107 (8,4)	0,829 (6,3)	0,787 (6,1)	0,576 (4,9)	4,985 (39,0)

ist nicht immer grösser als der der Galle, und zwar beträgt der Kalkgehalt der Galle in 6 Stunden durchschnittlich 2,152–4,828 mg und der des Harns 1,753–5,810 mg.

TABELLE I B.

Hündin I. (10 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Fisch 30 g, Gemüse 80 g,
Soja-Suppe 20 ccm u. Wasser 1000 ccm.

Kalzium in Harn mg(ccm)								
	St. Dat.	1 St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.	6 St.	Gesamt menge.
Kontrolle	1/IX	0,613 (8,0)	0,388 (14,6)	0,507 (42,0)	1,153 (14,0)	0,877 (10,5)	1,518 (12,6)	4,695 (99,7)
	14/ „	0,659 (7,2)	0,700 (11,8)	0,701 (17,4)	0,843 (22,0)	0,632 (11,0)	0,478 (10,6)	4,013 (88,0)
	Durch- schnitts wert.	0,636 (7,6)	0,544 (13,2)	0,604 (29,7)	0,998 (18,9)	0,755 (10,8)	0,998 (11,6)	4,535 (90,9)
1% Na- cholatlös. 10 ccm.	10/IX	0,770 (6,0)	0,650 (12,0)	0,686 (7,4)	0,666 (9,2)	0,574 (11,8)	0,421 (8,6)	3,767 (55,0)
	16/ „	0,659 (15,8)	0,447 (9,2)	0,484 (13,2)	0,500 (13,5)	0,473 (6,4)	0,558 (17,4)	3,121 (75,5)
	Durch- schnitts wert.	0,714 (10,9)	0,549 (10,6)	0,585 (10,3)	0,583 (11,4)	0,524 (9,1)	0,490 (13,0)	3,446 (65,3)
2% Na- cholatlös. 10 ccm.	30/IX	1,125 (26,5)	1,462 (13,0)	1,375 (16,0)	1,228 (14,0)	1,179 (24,0)	0,906 (5,0)	7,275 (98,5)
	12/X	1,035 (34,0)	1,380 (21,0)	1,122 (15,0)	1,201 (17,0)	1,330 (13,0)	1,128 (13,0)	7,196 (113,0)
	Durch- schnitts wert.	1,080 (30,3)	1,421 (17,0)	1,249 (15,5)	1,215 (15,5)	1,255 (18,5)	1,017 (9,0)	7,237 (105,8)
0,05 g Cholsäure pro kg per os.	23/X	1,403 (38,0)	0,616 (17,0)	0,716 (19,0)	0,674 (9,0)	0,779 (14,0)	0,684 (8,0)	4,872 (105,0)
	28/ „	0,563 (12,0)	1,103 (12,0)	1,020 (14,0)	0,926 (12,0)	1,057 (16,0)	0,821 (7,0)	5,490 (73,0)
	Durch- schnitts wert.	0,933 (25,0)	0,860 (14,5)	0,868 (16,5)	0,800 (11,0)	0,918 (15,0)	0,753 (7,5)	5,187 (89,5)

Bei Zufuhr von Cholsäure wird die Kalkausscheidung in der Galle mit der Vermehrung der Gallenmenge gesteigert; diese Steigerung tritt eine Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure am

TABELLE II A.

Hündin II. (10 Kg) Nahrung: Reis 150 g, Fisch 30 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 20 ccm u. Wasser 800 ccm.

Kalzium in Galle mg(ccm)								
	St. Dat.	1 St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.	6 St.	Gesam t menge.
Kontrolle	18/IX	0,878 (8,0)	0,609 (6,0)	0,482 (4,6)	0,634 (6,4)	0,543 (5,4)	0,513 (5,0)	3,659 (35,4)
	24/ „	0,591 (5,4)	0,668 (5,8)	0,514 (4,6)	0,655 (6,2)	0,509 (4,4)	0,549 (5,6)	0,348 (32,0)
	Durch- schnitts wert.	0,735 (6,7)	0,639 (5,9)	0,498 (4,6)	0,645 (6,3)	0,526 (4,9)	0,531 (5,3)	3,574 (33,7)
1% Na- cholatlös. 10 ccm.	20/IX	1,317 (11,2)	0,795 (8,2)	0,556 (5,0)	0,582 (5,6)	0,324 (3,0)	0,572 (5,8)	4,152 (38,6)
	26/ „	1,330 (9,6)	0,976 (9,2)	0,752 (7,0)	0,715 (5,2)	0,507 (4,8)	0,345 (3,4)	4,625 (39,2)
	Durch- schnitts wert.	1,324 (10,4)	0,868 (8,6)	0,654 (6,0)	0,651 (5,4)	0,416 (3,9)	0,409 (4,6)	4,322 (38,9)
2% Na- cholatlös. 10 ccm.	3/X	1,653 (11,0)	0,812 (6,2)	0,603 (4,6)	0,451 (4,0)	0,557 (4,6)	0,439 (4,2)	4,505 (34,6)
	10/ „	2,951 (28,2)	0,982 (9,4)	0,597 (5,2)	0,570 (5,4)	0,404 (3,4)	0,178 (1,4)	5,682 (53,0)
	Durch- schnitts wert.	2,302 (19,6)	0,897 (7,8)	0,600 (4,9)	0,506 (4,7)	0,481 (4,0)	0,309 (2,8)	5,095 (43,8)

stärksten auf, und zwar beträgt der Kalkgehalt der Galle durchschnittlich 1,072–5,271 mg.

Die Kalkausscheidung in der Galle wird also eine Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure gegenüber der Kontrolle um 80,1–334,7% gesteigert. Nach 2 Stunden ist die Vermehrung des Kalkes in der Galle nicht mehr so deutlich, und nach 3 Stunden wird die

TABELLE II B.

Hündin II. (10 Kg) Nahrung: Reis 150 g, Fisch 30 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 20 cem u. Wasser 800 cem.

Kalzium in Harn mg(cem)								
	St. Dat.	1 St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.	6 St.	Gesamt menge
Kontrolle	18/IX	1,297 (27,6)	1,003 (7,2)	0,807 (8,2)	0,685 (9,8)	0,532 (12,2)	0,439 (2,4)	4,763 (67,4)
	24/ „	1,681 (30,0)	1,300 (19,4)	0,955 (17,4)	1,008 (11,2)	0,870 (11,0)	1,040 (11,2)	6,850 (100,2)
	Durch- schnitts wert.	1,489 (28,8)	1,152 (13,3)	0,889 (12,8)	0,847 (10,5)	0,701 (11,6)	0,740 (6,8)	5,810 (83,8)
1% Na- cholatlös. 10 cem.	20/IX	1,226 (23,4)	0,627 (7,8)	0,630 (4,8)	0,521 (8,0)	0,403 (9,0)	0,213 (3,6)	3,620 (56,6)
	26/ „	1,479 (4,4)	0,985 (9,4)	1,888 (20,0)	1,010 (21,4)	0,491 (6,4)	0,383 (6,8)	6,236 (88,4)
	Durch- schnitts wert.	1,353 (23,9)	0,806 (8,6)	1,259 (12,4)	0,766 (14,7)	0,447 (7,7)	0,298 (5,2)	4,929 (72,5)
2% Na- cholatlös. 10 cem.	3/X	3,108 (26,0)	2,787 (17,0)	1,915 (18,0)	1,719 (12,0)	1,680 (12,0)	1,353 (7,0)	12,562 (92,0)
	10/ „	5,963 (102,2)	5,177 (37,0)	4,421 (43,0)	4,589 (37,0)	4,639 (52,0)	4,337 (24,0)	29,116 (295,0)
	Durch- schnitts wert.	4,536 (64,0)	3,982 (27,0)	3,168 (30,5)	3,150 (24,4)	3,160 (32,0)	2,845 (15,5)	20,841 (193,5)

Kalkausscheidung vielmehr herabgesetzt.

Der gesamte Kalkgehalt in der 6-stündigen Galle beträgt durchschnittlich 3.549–9.292 mg. Die Kalkausscheidung der Galle in 6 Stunden wird also, wie aus den Tabellen I–III ersichtlich ist, durch Cholsäure gegenüber der Kontrolle um 20,9–92,5% vermehrt.

Was die Kalkausscheidung im Harn bei Zufuhr von Cholsäure

TABELLE III A.

Hündin III. (19 Kg) Nahrung: Reis 250 g, Fisch 120 g, Soja-Suppe
35 cem u. Wasser 1200 cem.

Kalzium in Galle mg (cem)								
	St. Dat.	1 St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.	6 St.	Gesamt menge.
Kontrolle	18/XI	0,938 (7,0)	0,615 (2,6)	0,821 (3,6)	0,536 (2,6)	0,658 (3,2)	0,382 (2,4)	3,952 (21,4)
	23/ „	1,189 (7,4)	1,376 (8,0)	0,716 (3,4)	0,309 (2,8)	0,598 (4,2)	0,521 (2,8)	4,709 (28,6)
	27/ „	1,430 (8,6)	1,357 (7,4)	1,311 (7,2)	0,844 (4,6)	0,910 (5,8)	0,780 (5,2)	6,632 (38,8)
	Durch- schnitts wert.	1,186 (7,7)	1,116 (6,0)	0,983 (4,7)	0,563 (3,3)	0,419 (4,4)	0,561 (3,5)	4,828 (29,6)
1% Na- cholatlös. 19. cem.	21/XI	6,499 (12,0)	0,931 (5,6)	1,086 (6,4)	0,715 (5,4)	0,868 (5,4)	0,646 (4,6)	10,803 (39,4)
	25/ „	5,119 (13,6)	1,360 (9,8)	0,803 (4,6)	0,898 (5,2)	0,290 (3,2)	0,652 (3,8)	9,122 (40,2)
	29/ „	4,194 (12,4)	1,250 (9,0)	0,872 (6,4)	0,723 (4,6)	0,600 (4,0)	0,339 (2,6)	7,958 (39,0)
	Durch- schnitts wert.	5,271 (12,7)	1,197 (8,1)	0,920 (5,8)	0,772 (5,1)	0,586 (4,2)	0,546 (3,3)	9,292 (39,2)
2% Na- cholatlös. 19. cem.	9/XII	3,080 (18,4)	2,118 (9,6)	1,329 (7,2)	0,790 (4,8)	0,740 (4,0)	0,397 (2,2)	8,454 (44,2)
	11/ „	1,871 (9,4)	1,175 (7,0)	1,104 (6,2)	0,907 (5,0)	0,861 (4,6)	0,886 (5,0)	6,807 (37,2)
	12/ „	3,178 (16,2)	2,257 (10,2)	1,535 (6,4)	0,944 (5,0)	0,992 (5,4)	0,656 (4,2)	9,562 (47,4)
	Durch- schnitts wert.	2,710 (14,7)	1,850 (8,9)	1,323 (6,6)	0,880 (4,9)	0,864 (4,7)	0,646 (3,8)	8,273 (43,6)
0,05 g Cholsäure pro kg per os.	4/XII	1,434 (9,4)	1,240 (7,2)	1,099 (16,2)	0,661 (14,0)	0,885 (10,0)	1,573 (9,0)	6,892 (65,8)
	5/ „	1,618 (10,4)	3,625 (20,4)	2,833 (18,2)	2,286 (15,0)	0,989 (6,9)	0,614 (4,2)	11,965 (75,1)
	6/ „	2,908 (19,2)	2,806 (18,4)	1,845 (11,2)	1,445 (9,0)	0,835 (7,6)	1,080 (7,4)	10,921 (72,8)
	Durch- schnitts wert.	1,987 (13,0)	2,557 (15,3)	1,926 (15,5)	1,464 (12,7)	0,903 (8,2)	1,090 (6,9)	9,927 (71,6)

TABELLE III B.

Hündin III. (19 Kg) Nahrung: Reis 250 g, Fisch 120 g,
Soja-Suppe 35 cem u. Wasser 1200 cem.

Kalzium in Harn mg(cem)								
	St. Dat.	1 St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.	6 St.	Gesamt menge
Kontrolle	18/XI	0,869 (11,0)	0,472 (12,0)	0,371 (8,0)	0,096 (7,0)	0,056 (7,0)	0,131 (8,0)	1,995 (53,0)
	23/ „	1,269 (21,0)	0,115 (9,0)	0,109 (7,0)	0,067 (7,0)	0,126 (7,0)	0,083 (6,0)	1,769 (57,0)
	27/ „	0,398 (6,0)	0,312 (7,0)	0,280 (8,0)	0,195 (7,0)	0,227 (7,0)	0,270 (7,0)	1,682 (42,0)
	Durch- schnitts wert.	0,845 (13,0)	0,300 (9,0)	0,353 (8,0)	0,119 (7,0)	0,136 (7,0)	0,161 (7,0)	1,753 (51,0)
1% Na- cholatlös. 19. cem.	21/XI	0,494 (9,0)	0,131 (6,0)	0,103 (6,0)	0,072 (6,0)	0,124 (6,0)	0,136 (7,0)	1,006 (40,0)
	25/ „	0,243 (6,0)	0,126 (11,0)	0,098 (6,0)	0,072 (7,0)	0,115 (11,0)	0,099 (7,0)	0,753 (48,0)
	29/ „	0,179 (6,0)	0,409 (7,0)	0,345 (12,0)	0,195 (7,0)	0,173 (8,0)	0,056 (6,0)	1,357 (46,0)
	Durch- schnitts wert.	0,335 (7,0)	0,222 (8,0)	0,182 (8,0)	0,113 (7,0)	0,137 (8,0)	0,097 (7,0)	1,086 (45,0)
2% Na- cholatlös. 19. cem.	9/XII	0,735 (15,0)	0,461 (8,0)	0,370 (8,0)	0,285 (11,0)	0,341 (8,0)	0,388 (4,0)	2,580 (0,45)
	11/ „	0,713 (8,0)	0,539 (8,0)	0,434 (6,0)	0,312 (6,0)	0,376 (7,0)	0,434 (6,0)	2,808 (41,0)
	12/ „	0,730 (35,0)	0,701 (11,0)	0,405 (8,0)	0,405 (8,0)	0,411 (9,0)	0,557 (9,0)	3,209 (80,0)
	Durch- schnitts wert.	0,726 (19,0)	0,567 (9,0)	0,403 (7,0)	0,334 (8,0)	0,376 (8,0)	0,460 (6,0)	2,866 (57,0)
0,05 g Cholsäure pro kg per os.	4/XII	0,419 (8,0)	0,987 (9,0)	0,987 (10,0)	0,762 (10,0)	0,727 (14,0)	0,409 (7,0)	4,291 (58,0)
	5/ „	0,505 (7,0)	0,773 (9,0)	0,869 (10,0)	0,559 (9,0)	0,526 (8,0)	0,205 (7,0)	3,437 (50,0)
	6/ „	1,299 (14,0)	0,968 (12,0)	0,475 (11,0)	0,399 (9,0)	0,179 (9,0)	0,190 (7,0)	3,510 (62,0)
	Durch- schnitts wert.	0,741 (10,0)	0,909 (10,0)	0,777 (10,0)	0,573 (9,0)	0,477 (10,0)	0,268 (7,0)	3,745 (56,0)

betrifft, so wurde gefunden, dass der gesamte Kalkgehalt im 6-stündigen Harn durchschnittlich 1,086–4,929 mg beträgt, und dass gegenüber der Kontrolle die Kalkausscheidung im Harn durch Cholsäure um 15,2–35,4% herabgesetzt wird, während sie prozentual im allgemeinen nicht herabgesetzt wird.

Die Kalkausscheidung in der Galle bei Zufuhr einer grösseren Menge Cholsäure wird viel stärker gesteigert, bes. nach einer Stunde, als bei der einer kleineren Menge und der Kalkgehalt dabei beträgt durchschnittlich 1,972–2,780 mg. Die Kalkausscheidung in der Galle bei Zufuhr einer grösseren Menge wird gegenüber der Zufuhr einer kleineren Menge um 128,5–289,7% vermehrt.

Der gesamte Kalkgehalt der Galle beträgt in 6 Stunden bei Zufuhr einer grösseren Menge Cholsäure durchschnittlich 4,247–8,273 mg und ist etwas grösser als bei der Zufuhr einer kleineren Menge; Die Kalkausscheidung in der Galle ist hier gegenüber der Kontrolle um 42,6–92,7% gesteigert.

Die Kalkausscheidung im Harn wird bei Zufuhr einer grösseren Menge Cholsäure gegenüber der bei einer solchen einer kleineren Mengen stark vermehrt; der Kalkgehalt im Harn beträgt in 6 Stunden durchschnittlich 2,866–20,841 mg, und dieser Wert ist im Vergleich zu dem der Kontrolle um 59,6–22,0% vermehrt.

Um eine vermehrte Kalkausscheidung im Harn herbeizuführen, muss also Cholsäure über eine bestimmte Menge (0,01 g pro Kilo) hinaus verabreicht werden.

Bei peroraler Zufuhr von Cholsäure wird die Kalkausscheidung in der Galle von Stunde zu Stunde vermehrt, und diese Vermehrung tritt 2–3 Stunden nach der Cholatzufuhr am stärksten, aber verglichen mit der Kontrolle nach 4–5 Stunden am stärksten auf.

Der Kalkgehalt in der 6-stündigen Galle bei peroraler Zufuhr von Cholsäure beträgt durchschnittlich 4,985–9,927 mg; er ist gegenüber der Kontrolle um 105,6–131,6% vermehrt.

Hierbei wird auch die Kalkausscheidung im Harn beträchtlich vermehrt, und der Kalkgehalt im 6-stündigen Harn beträgt durchschnittlich 3,745–5,182 mg, und zwar ist er im Vergleich zu dem

der Kontrolle um 14,3–113,6% vermehrt.

Sowohl bei subkutaner als auch bei peroraler Zufuhr der Cholsäure wird die Kalkausscheidung im Harn sowie in der Galle, bes. in der letzteren, vermehrt; diese Vermehrung geht im allgemeinen mit der verabreichten Cholsäuremenge fast parallel, und zwar tritt die Kalkausscheidung bei peroraler Zufuhr der Cholsäure in der Galle viel stärker auf als im Harn.

2. Bei thyreoparathyreopriver Gallenfistelhündin.

Zuerst wurde als Kontrolle die Kalkausscheidung im Harn u. in der Galle der Fistelhündin zweistündlich 6 Stunden lang beobachtet, dann bei dem Tier die Thyreoparathyreoidektomie ausgeführt, wodurch die Gallenausscheidung stark vermindert wurde. Diese Hündin wurde dann zum Versuch verwendet und die Kalkausscheidung im Harn sowie in der Galle alle 2 Stunden ohne oder mit Zufuhr von Cholsäure untersucht.

Aus den Tabellen IV–IX lässt sich ersehen, dass vor der Thyreoparathyreoidektomie die Kalkausscheidung in der Galle sowie im Harn einer grossen zeitlichen Schwankung unterliegt, und dass der Kalkgehalt in der 6-stündigen Galle der absoluten Menge nach durchschnittlich 2,805–6,119 mg, prozentual 11,07–19,99%, und im 6-stündigen Harn der absoluten Menge nach 1,123–8,602 mg, prozentual 2,51–11,63% beträgt.

Nach der Parathyreoidektomie wird die Gallen- und Kalkausscheidung in der Galle mit der Zeit allmählich herabgesetzt. Besonders wurde bei Hündin I blutige Galle aus der Fistel nur ganz wenig ausgeschieden.

Diese Daten sprechen gegen die Ergebnisse von Zamaroni u. Guassordo (1931). Die Kalkausscheidung im Harn wird nach der Thyreoparathyreoidektomie ebenfalls mit der Zeit allmählich stark vermindert.

Durch subkutane Zufuhr von Cholsäure wird aber die Kalkausscheidung in der Galle und im Harn plötzlich beträchtlich vermehrt, und zwar beträgt dabei der Kalkgehalt in der 6-stündigen Galle der absoluten Menge nach durchschnittlich 0,677–3,068 mg und prozentual 3,78–12,22%, während der Kalkgehalt im 6-

TABELLE IV A.

Hündin I. (10 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Gemüse 50 g, Fisch 50 g,
Soja-Suppe 30 ccm u. Wasser 1000 ccm.

Kalzium in Galle (mg)						
St. Dat.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
14/XII	0,970	0,926	0,941	2,837	26,27	
15/ „	1,729	1,018	0,888	3,635	21,61	
16/ „	1,259	1,445	1,146	3,850	17,99	
17/ „	1,503	1,352	1,297	4,152	14,07	
Durchschnitts- wert.	1,363	1,185	1,068	3,616	19,99	
18/XII	Thyreo-Parathyreoidektomie.					
19/ „	0,011 0,109			0,120	8,00	
20/ „	deutliche Blutung					
21/ „		„				
22/ „		„				
23/ „				0,677	3,85	←2% Cholatlös.
24/ „				0,269	3,74	
25/ „				0,098	5,44	
26/ „				0,209	20,9	
27/ „	deutliche Blutung					
28/ „				0,482	8,93	←2% Cholatlös.
29/ „	Sterben					

stündigen Harn der absoluten Menge nach durchschnittlich 0,854–1,961 mg und prozentual 1,11–5,6% beträgt. Diese Vermehrung des Kalkes in der Galle sowie im Harn bei der thyreoparathyreopriven Hündin bei Zufuhr von Cholsäure reicht nicht an den Wert bei der normalen Hündin heran.

TABELLE IV B.

Hündin I. (10 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Gemüse 50 g, Fisch 50 g,
Soja-Suppe 30 ccm u. Wasser 1000 ccm.

Kalzium in Harn(mg)						
Dat. \ St.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
14/XII	0,817	0,266	0,144	1,227	1,21	
15/ „	0,536	0,177	0,369	1,082	1,33	
16/ „	0,213	0,948	0,814	2,975	3,23	
17/ „	2,507	2,615	1,715	6,837	3,78	
Durchschnitts- wert.	1,268	1,002	0,761	3,031	2,51	
18/XII	Thyreo-Parathyreoidektomie.					
19/ „	0,295	0,358	0,290	0,943	1,75	
20/ „	0,301	0,158	0,227	0,686	1,18	
21/ „	0,204	0,210	0,181	0,585	1,19	
22/ „	0,130	0,147	0,090	0,367	0,92	
23/ „	0,420	0,470	0,461	1,353	1,99	←2% Cholatlös.
24/ „	0,261	0,250	0,227	0,738	1,57	
25/ „	0,051	0,179	0,147	0,377	1,68	
26/ „	0,073	0,073	0,124	0,270	0,79	
27/ „	0,243	0,318	0,231	0,782	2,37	←2% Cholatlös.
28/ „	0,301	0,446	0,405	1,152	4,11	
29/ „	Sterben.					

Sowohl bei normaler als auch bei thyreoparathyreopriver Hündin wird die Kalkausscheidung im Harn und in der Galle durch Zufuhr von Cholsäure in starkem Masse vermehrt, wird aber dadurch nicht auf den normalen Wert gebracht.

Die Cholsäure kann also nicht das Parathhormon der Neben-

TABELLE V A.

Hündin II. (19 Kg) Nahrung: Reis 250 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 ccm u. Wasser 1200 ccm.

Kalzium in Galle(mg)

Dat.	St.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
18/I		2,971	1,290	1,527	5,788	17,23	
19/„		2,096	1,797	2,071	5,964	21,77	
20/„		3,031	2,182	1,631	68,44	19,33	
Durchschnitt- wert.		2,699	1 029	1,743	6,199	19,44	
21/I		Thyreo-Parathyreoidektomie,					
22/„		1,202	0,972	1,027	3,201	13,91	
23/„		1,624	1,002	0,622	3,248	14,90	
24/„		2,095	0,774	0,709	3,578	12,42	
25/„		0,970	1,195	0,605	2,770	7,70	
26/„		0,776	0,559	0,150	1,485	8,53	←Muskelzuckung
27/„		0,893	0,562	0,441	1,896	12,15	
28/„		1,878	0,732	0,458	3,068	11,28	←2% Na-Cholatlös.
29/„		0,564	0,639	0,479	1,682	11,21	
30/„		0,789	0,477	0,028	1,303	9,58	
31/„		2,622	1,173	0,574	4,369	9,67	←2% Na-Cholatlös.
1/II		1,065	1,368	0,601	3,034	12,41	
2/„		2,001	1,021	0,916	3,938	15,85	
3/„		1,480	0,769	0,999	3,248	11,44	
4/„		2,776	1,501	0,823	5,100	11,97	←2% Na-Cholatlös.
5/„		0,446	0,603	1,255	2,305	6,30	
10/„		1,842	0,757	0,754	3,353	9,80	
15/„		1,653	1,304	1,203	4,160	19,62	
20/„		3,568	2,898	2,904	9,380	12,47	
25/„		0,911	2,444	0,926	4,281	21,62	

TABELLE V B.

Hündin II. (19 Kg) Nahrung: Reis 250 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 ccm u. Wasser 1200 ccm.

Kalzium in Harn(mg)

Dat.	St.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
18/I		0,597	0,117	0,239	0,953	2,52	
19/„		0,475	0,423	0,516	1,414	4,42	
20/„		0,422	0,330	0,248	1,000	2,94	
Durchschnitts- wert.		0,465	0,290	0,334	1,123	3,29	
21/I		Thyreo-Parathyreoidektomie.					
22/„		0,585	0,306	0,376	1,267	3,96	
23/„		0,621	0,353	0,179	1,163	2,33	
24/„		0,327	0,158	0,189	0,674	1,82	
25/„		0,242	0,188	0,135	0,565	1,53	
26/„		0,701	0,167	0,330	1,198	3,81	
27/„		0,296	0,147	0,159	0,601	2,15	
28/„		0,560	0,324	0,283	1,167	2,38	←2% Na-Cholat.
29/„		0,460	0,194	0,212	0,866	2,79	
30/„		0,466	0,318	0,336	1,120	2,55	
31/„		0,843	0,678	0,407	1,928	2,44	←2% Na-Cholat.
1/II		0,271	0,206	0,200	0,677	2,49	
2/„		0,184	0,214	0,271	0,669	1,63	
3/„		0,256	0,291	0,244	0,791	1,58	
4/„		0,761	0,324	0,324	1,409	2,43	←2% Na-Cholat.
5/„		0,289	0,324	0,442	1,055	1,67	
10/„		0,279	0,137	0,089	0,505	0,89	
15/„		0,307	0,303	0,244	0,944	1,89	
20/„		0,654	0,450	0,414	1,518	1,18	
25/„		0,232	0,172	0,089	0,493	0,84	

TABELLE VI A.

Hündin III. (8,5 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 cem u. Wasser 1000 cem.

Kalzium in Galle(mg)						
St. Dat.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
13/II	1,610	0,338	0,574	2,522	8,41	
14/ „	1,547	0,307	0,581	2,435	10,97	
15/ „	2,000	0,759	0,700	3,459	13,84	
Durchschnitts- wert.	1,719	0,468	0,618	2,805	11,07	
16/II	Thyreo-Parathyreoidektomie.					
17/ „	0,802	0,595	0,343	1,740	10,48	
18/ „	0,337	0,046	0,221	0,604	3,97	← Krampf-anfall
19/ „	0,582	0,090	0,012	0,684	4,69	← 2% Na-Cholatlös.
20/ „	0,306	0,140	0,078	0,524	5,04	
21/ „	0,112	0,017	0,010	0,139	3,04	
22/ „	0,348	0,079	0,006	0,433	6,98	← 2% Na-Cholatlös.
23/ „	0,165	0,151	0,011	0,327	9,61	
24/ „	Sterben					

TABELLE VI B.

Hündin III. (8,5 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 cem u. Wasser 1000 cem.

Kalzium in Harn(mg)						
St. Dat.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
13/II	1,119	0,655	0,315	2,089	6,48	
14/ „	1,329	0,898	0,648	2,873	5,04	
15/ „	1,136	1,672	1,005	3,813	5,69	
Durchschnitts- wert.	1,194	1,075	0,656	2,925	5,74	
16/II	Thyreo-Parathyreoidektomie.					
17/ „	0,815	0,791	0,434	2,040	3,24	
18/ „	0,406	0,515	0,394	1,315	2,19	← Krampf-anfall
19/ „	0,769	0,527	0,357	1,653	2,40	← 2% Na-Cholatlös.
20/ „	0,208	0,351	0,363	0,922	1,65	
21/ „	0,398	0,291	0,244	0,933	1,64	
22/ „	0,636	0,696	0,387	1,719	2,57	← 2% Na-Cholatlös.
23/ „	0,636	0,625	0,458	1,719	3,51	
24/ „	Sterben					

TABELLE VII A.

Hündin IV. (15 Kg) Nahrung: Reis 250 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 cem u. Wasser 1200 cem.

Kalzium in Galle(mg)						
Dat. \ St.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
26/II	1,645	1,356	1,225	4,226	26,41	
27/ „	1,784	1,449	1,323	4,556	21,70	
28/ „	0,964	0,795	0,614	2,373	11,87	
Durchschnitts- wert.	1,464	1,200	1,054	3,718	19,99	
1/III	Thyreo-Parathyreoidektomie.					
2/ „	0,814	0,203	0,443	1,460	10,28	
3/ „	0,334	0,332	0,315	0,981	5,91	
4/ „	0,617	0,348	0,274	1,239	4,88	← Krampfanfall
5/ „	1,614	0,576	0,449	2,639	12,22	← 2% Cholatlös.
6/ „	0,229	0,193	0,359	0,781	5,01	
7/ „	0,505	0,240	0,233	0,978	15,13	
8/ „	6,292	0,071	0,088	1,451	7,33	← 2% Cholatlös.
9/ „	0,605	0,447	0,324	1,376	12,07	
12/ „	Sterben					

TABELLE VII B.

Hündin IV. (15 Kg) Nahrung: Reis 250 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Sola-Suppe 30 cem u. Wasser 1200 cem.

Kalzium in Harn(mg)						
Dat. \ St.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
26/II	4,350	1,674	1,634	7,658	13,20	
27/ „	2,058	2,190	1,662	5,910	6,95	
28/ „	4,623	4,159	3,457	12,239	14,75	
Durchschnitts- wert.	3,677	2,674	2,251	8,602	11,63	
1/III	Thyreo-Parathyreoidektomie.					
2/ „	1,065	0,839	0,517	2,421	2,18	
3/ „	0,848	0,934	0,580	2,362	2,75	
4/ „	0,256	0,220	0,315	0,791	1,10	← Krampfanfall
5/ „	0,316	0,292	0,246	0,854	1,11	← 2% Cholatlös.
6/ „	0,749	0,584	0,536	1,869	1,80	
7/ „	0,434	0,458	0,339	1,231	1,87	
8/ „	0,363	0,375	0,279	0,917	1,24	← 2% Cholatlös.
9/ „	0,934	0,934	1,381	3,249	4,78	
12/ „	Sterben					

TABELLE VIII A.

Hündin V. (G Kg) Nahrung: Reis 200 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 ccm u. Wasser 1000 ccm.

Kalzium in Galle(mg)							
Dat.	St.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
13/III		1,157	1,053	0,866	3,076	11,83	
14/ „		1,273	0,963	0,877	3,113	10,88	
15/ „		1,169	0,453	1,712	3,334	11,26	
Durchschnitts- wert.		1,200	0,823	1,152	3,175	11,32	
16/III	Thyreo-Parathyreoidektomie.						
17/ „		0,268	0,242	0,196	0,706	5,60	
18/ „		0,130	0,056	0,165	0,351	3,08	← Krampfanfall
19/ „		0,286	0,128	0,213	0,627	3,78	← 2% Cholatlös.
20/ „		0,118	0,021	0,098	0,236	2,19	
21/ „		Sterben					

TABELLE VIII B.

Hündin V. (9 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 ccm u. Wasser 1000 ccm.

Kalzium in Harn(mg)							
Dat.	St.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
13/III		0,833	0,926	0,812	2,571	7,56	
14/ „		1,104	0,906	0,490	2,500	6,25	
15/ „		0,887	0,681	0,639	2,207	8,49	
Durchschnitts- wert.		0,941	0,838	0,647	2,426	7,43	
16/III		Thyreo-Parathyreoidektomie.					
17/ „		0,660	0,640	0,557	1,857	7,14	
18/ „		0,625	0,464	0,228	1,317	3,87	← Krampfanfall
19/ „		0,640	0,743	0,578	1,961	5,60	← 2% Cholatlös.
20/ „		0,372	0,248	0,125	0,745	2,66	
21/ „		Sterben.					

TABELLE IX A.

Hündin VI. (9 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 ccm u. Wassr 1000 ccm.

Kalzium in Galle (mg)						
St. Dat.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
14/XII	1,455	1,306	1,317	4,078	15,56	
15/ „	1,301	1,344	1,421	4,066	14,63	
16/ „	1,490	1,473	1,181	4,144	16,31	
17/ „	1,580	1,336	1,018	3,934	13,94	
Durchschnitts- wert.	1,457	1,365	1,234	4,056	15,11	
18/XII	Thyreo-Parathyreoidektomie.					
19/ „		1,463	0,999	2,462	14,65	← Muskelzuckung ohne T. anfall 2% Na-Cholatlös.
20/ „				1,423	8,18	
21/ „	0,664	0,356	0,323	1,343	6,40	
22/ „	0,965	0,446	0,364	1,775	6,93	
23/ „	0,740	0,339	0,200	1,279	5,08	
24/ „				0,651	4,12	
25/ „	0,570	0,034	0,039	0,643	3,31	
26/ „	0,926	0,258	0,267	1,451	5,57	
27/ „	1,147	0,410	0,383	1,940	6,47	
28/ „	1,231	0,667	0,532	2,412	6,97	
1933 2/I	Sterben					

schilddrüse vertreten, sie vermehrt vielmehr unabhängig von der Wirkung des Parathormons die Kalkausscheidung im Harn und in der Galle.

Es ist aber merkwürdig, dass der tetanische Anfall durch Thyreoparathyreoidektomie bei der eine Gallenblasen fistel tragen-

TABELLE IX B.

Hündin VI. (9 Kg) Nahrung: Reis 200 g, Fisch 50 g, Gemüse 50 g,
Soja-Suppe 30 ccm u. Wasser 1000 ccm.

Kalzium in Harn (mg)						
St. Dat.	2 St.	4 St.	6 St.	Gesamt- menge	mg%	Bemerkung.
14/XII	0,423	0,905	1,633	2,961	3,75	
15/ „	1,693	2,035	1,699	5,427	5,22	
16/ „	1,492	1,384	1,367	4,243	4,04	
17/ „	1,885	1,657	1,407	4,949	3,61	
Durchschnitts- wert.	1,373	1,495	1,527	4,395	4,16	
18/XII	Thyreo-Parathyreoidektomie.					
19/ „	0,289	0,415	0,267	0,971	2,25	←
20/ „	0,670	0,859	0,261	1,790	3,32	←
21/ „	0,746	0,603	0,301	1,650	2,39	←
22/ „	0,700	0,855	0,837	2,392	5,56	←
23/ „	0,591	1,042	0,757	2,390	6,64	←
24/ „	0,341	0,346	0,141	0,828	3,07	←
25/ „	2,300	0,244	0,278	2,822	1,86	←
26/ „	0,646	0,164	0,147	0,957	0,90	←
27/ „	0,620	0,313	0,545	1,478	1,78	←
28/ „	1,171	1,165	1,159	3,495	3,80	←
2/I, 1933	gestorben					

Muskelzuckung
ohne T. anfall
2%
Na-Cholatlös.

den Hündin viel leichter auftritt als bei der normalen Hündin, dass durch Zufuhr von Cholsäure die Kalkausscheidung im Harn und in der Galle der thyreoparathyreopriven Hündin mit der Zeit allmählich vermehrt wird, bis sie den normalen Wert erreicht hat, und dass die Hündin über einen Monat lang ohne tetanischen

Anfall gelebt hat, wie sich aus der Tabelle V ersehen lässt.

Neuerdings soll nach Brougher (1928) durch Lebertran, nach Demole u. Christ (1929) u. Jones, Rapoport u. Hodes (1930) durch bestrahltes Ergosterin der tetanische Anfall beim thyreoparathyreopriven Hunde verhütet werden, was alles wahrscheinlich auf der Wirkung des Vitamin D beruht, aus dem nach Higashi (1930) u. Tanaka (1933) die Gallensäure gebildet werden soll.

Die den tetanischen Anfall verhütende Wirkung des Vitamin D soll also zum Teil auf die aus diesem gebildete Gallensäure zurückgeführt werden können.

Darauf weist auch die Tatsache hin, dass der tetanische Anfall der thyreoparathyreopriven Hündin durch tägliche subkutane Zufuhr von Cholsäure unter Vermehrung des Kalkes im Harn u. in der Galle zur minimalen Muskelzuckung abgeschwächt wird, wie Tabelle IX zeigt, und dass bei einer thyreoparathyreopriven Hündin die Ausscheidung von einer kleineren Menge blutiger Galle infolge Zufuhr von Cholsäure verschwindet und wieder normale Galle unter ihrer Vermehrung ausgeschieden wird, wie aus der Tabelle IV ersichtlich ist.

Es ist allgemein anerkannt, dass die Tetanie bei Parathyreoidektomie nicht nur auf dem Mangel an Kalkion im Organismus, sondern auch auf einer anderen unbekannten Ursache, z. B. auf Vergiftung durch Eiweisspaltprodukte wie Guanidinbasen, beruhen dürfte, wie Berkeley u. Beebe (1910), Frouin (1910) u. Noel, Paton, Sharp u. Kühnau (1928) behauptet haben.

Der leichte tetanische Anfall der Gallenfistelhündin bei Thyreoparathyreoidektomie und seine Abschwächung durch Zufuhr von Cholsäure scheint mir darauf zu beruhen, dass im ersten Falle eine giftige Substanz durch die Gallenblasenfistel mit der Galle ausgeschieden, im zweiten Fall dieselbe durch die zugeführte Cholsäure entgiftet werden dürfte. Die entgiftende Wirkung der Cholsäure wurde schon von Okii (1934) in der Leber bewiesen.

Die Funktionsstörung der Leber, bes. ihre gestörte Entgiftung dürfte also wohl durch die Parathyreoidektomie hervorgerufen werden. Somit muss eine innige Beziehung zwischen der

Wirkung des Hormons in der Nebenschilddrüse und derjenigen der Leberfunktion bestehen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Kalkausscheidung in der Galle und im Harn der normalen Hündin wird sowohl durch subkutane als auch durch perorale Zufuhr von Cholsäure gesteigert. Diese Steigerung der Kalkausfuhr tritt viel stärker bei peroraler Zufuhr auf als bei subkutaner, und in der Galle stärker als im Harn.

2. Durch Thyreoparathyreoidektomie wird die Gallensekretion stark vermindert und die Kalkausfuhr im Harn u. in der Galle mit der Zeit beträchtlich herabgesetzt.

Diese verminderte Gallen- und Kalkausscheidung in der Galle sowie im Harn wird durch Zufuhr von Cholsäure wieder stark vermehrt, wenn auch diese Vermehrung den normalen Wert nicht wiederherstellen kann.

3. Die Kalkausfuhr im Harn sowie in der Galle steigernde Wirkung der Cholsäure tritt bei normaler sowie thyreoparathyreoprivier Hündin in gleicher Weise auf.

4. Der durch Thyreoparathyreoidektomie verursachte tetanische Anfall tritt bei der eine Gallenblasenfistel tragenden Hündin viel leichter auf als bei der normalen und wird durch Zufuhr von Cholsäure stark verzögert.

Die parathyreoprive Tetanie dürfte also eine innige Beziehung zu der Leberfunktion haben.

LITERATUR.

- Berkeley u. Beebe (1910): Zit nach Biedl, Innere Sekretion, s. 57.
 Brougher, J. C. (1928): Amer. J. of Physiol., **84**, 583.
 Collip, J. B. (1925): J. Biol. Chem., **63**, 395.
 Demole, V. u. Christ, A. (1929): Schmiedbergs., **146**, 361.
 De Waard, D. J. (1919): Bioch. Z., **97**, 176.
 Frouin, A. (1910): Zit nach Biedl, Innere Sekretion, s. 57.
 Fuziwara, Kanzi (1931): J. of Bioch., **13**, 465.
 Gillert, E. (1924): Z. f. ges. exp. Med., **43**, 539.
 Greenwald, I. (1925): J. Biol. Chem., **66**, 185.
 Gross, J. (1926): J. Biol. Chem., **68**, 325.
 Higashi, S. (1930): Arb. a. d. Med. Univ. Okayama, **1**, 582.
 Hosizima, T. (1933/34): J. of Bioch., **17**, 29. u. noch nicht publiziert.

- Inouye, T. (1922): Tokyo Igakkai Zasshi, **36**, 461 (Japanisch).
- Jones, J. H., Rapoport, M. u. Hodes, H. L. (1930): Jl. Biol. Chem., **86**, 267.
- Kitayama, K. (1927): Okayama Igakkai Zasshi, **444**, 1.
- Kuramoto, T. (1934): Jl. of Bioch., **19**, 437.
- MacCallum, W. G. u. Voegtlin, C. (1909): Jl. exp. Med., **11**, 118.
- Noel, Daton, Sharp u. Kühnau (1928): Zit nach Klinke, Erg. d. Physiol., **26**, 313.
- Okii, I. (1932): Jl. of Bioch., **16**, 217.
- Okii, I. (1934): Jl. of Bioch., **20**, 31.
- Ota, R. (1927/28): Jl. of Gastroenterolog., **2**, 1205 u. 1273 (Japanisch).
- Rey, J. Q. (1895): Schmiedbergs Arch., **35**, 294.
- Rüdel, G. (1894): „ **33**, 79.
- Sekitoo, T. (1930): Jl. of Bioch., **11**, 251. u. 391, **12**, 59.
- Tanaka, T. (1933): Jl. of Bioch., **18**, 33.
- Voit, E. (1892): Z. f. Biol., **29**, 325.
- Wollheim, E. (1929): Bioch. Z., **151**, 416.
- Zondek, S. G. (1922): Bioch. Z., **132**, 362.
- Zamaroni, V. u. Guassordo, G. (1931): Zit nach Rona, Ber. u. d. ges. Physiol., **58**, 545.

DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter Leitung von Prof. Dr. M. Tsuji.)

V. Mitteilung.

Über die Milchsäurebildung aus *d*-Alanin in der Magenwandung.

VON

KANAE WAKASUGI.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 22. Oktober 1934)

Im Durchblutungsversuche des Magens mit *d*-Alanin wurde *d*-Milchsäure aus dem Blute sowie aus dem Magensaft, welcher während der Durchblutung secerniert wurde, chemisch rein isoliert Matsuoka (1933). Vor kurzem beobachtete Ikeda, dass das Glycokoll und das Alanin in der Darmwand desaminiert wird, obwohl der Grad je nach der Art der Aminosäuren verschieden ist, um beim Alanin *d*-Milchsäure zu bilden (1934): Diese Tatsachen erregen unsere Interesse nicht wenig, weil bisher angenommen wurde, dass die Leber bei der Desaminierung die Hauptrolle spielt und die anderen Eingeweide dabei von geringerer Bedeutung sind Borstein (1929). Weitere Studien über die Milchsäurebildung aus dem *d*-Alanin in der Wandung des Verdauungskanals erst werden die Frage klären, ob die Desaminierung in der Schleimhaut oder in der Muskelschicht vor sich geht und in welcher von den beiden Schichten die Milchsäurebildung selbst stattfindet. Vorliegende Arbeit wurde hauptsächlich zur Klärung der zweiten Frage durchgeführt. Es bedarf keines Hinweises darauf, dass die Milchsäurebildung mit den chemischen Vorgängen im Muskel in innigem Zusammenhang steht. 1932 erschien eine Arbeit von Haarmann, laut der die Milchsäure aus der Brenztraubensäure im Muskelbrei des Magens gebildet wird. Für die Erkenntnis der chemischen Vorgänge im Magen muss es von grosser Bedeutung sein, ob die Umwandlung des Alanins in Milchsäure in der Schleim-

haut oder in der Muskelschicht vor sich geht. Um dieses Problem zu untersuchen, nahm ich in erster Linie einen Versuch darüber vor, ob sich die Milchsäure nach der Durchblutung mit *d*-Alanin nicht nur im Blute befindet, sondern auch in der Magenwandung und in welcher Schicht derselben hauptsächlich vorhanden ist. Hinsichtlich des Bildungsortes der Milchsäure könnte das Ergebniss als ein Anhaltspunkt dienen. Zum Experimente wurde Hundemagen gebraucht. Im Kontrollversuche, in welchem dem Blute kein *d*-Alanin zugefügt wurde, verschob sich der Wert des Amino-N und der Milchsäure im Blute durch die Durchblutung in einem bestimmten Zeitraum in ganz geringer Menge, u.zw. stieg der Wert des Amino-N von 10,19 mg% bis 9,28 mg% ab und der der Milchsäure von 19,58 mg% bis 23,32 mg% an, ganz ähnlich dem Resultate von Matsuoka. Harnstoff-N im Blute wurde durch die Durchströmung um 1,92 mg% vermindert. Um eben soviel vermehrt wurde der N in der Ammoniakfraktion vorgefunden, ganz ähnlich wie Sumida in dieser Zeitschrift schon zeigte. Nach der Durchblutung in der Magenwandung wurde die Milchsäure als 74,40 mg% in der Muskelschicht und auf 73,80 mg% in der Schleimhaut gefunden; der Harnstoff war Null in der Schleimhaut, ganz wenig in der Muskelschicht; der Ammoniak-N wurde in den beiden Schichten gleichwertig mit 3,36 mg% vorgefunden. Im II. Kontrollversuche, in welchem das Blut mit *d*-Alanin aber ohne Magen nur durch den Aparat leer geströmt wurde, verliefen die Verschiebungen der Werte der Milchsäure und des N in den verschiedenen Fraktionen im Blute fast in ähnlicher Weise wie im I. Kontrollversuche, aber nur in den N-Fractionen mindergradig. Im Hauptversuche, in welchem das Blut mit einer bestimmten Menge *d*-Alanin durchströmt wurde, verminderte sich der Amino-N von 58,43 mg% bis 28,00 mg% und stieg der Wert der Milchsäure von 20,24 mg% bis 38,53 mg% auf, was mit dem Resultate von Matsuka gut übereinstimmte. Nach der Durchblutung wurde in der Muskelschicht 68,00 mg% und in der Schleimhautschicht 128,20 mg% Milchsäure, also in der Muskelschicht um 13,60 mg% und in der Schleimhautschicht um 54,40 mg% mehr als im Kontrollversuche vorgefunden. Die Vermehrung der Milchsäure

in der Magenwandung mag auf mechanischer Ablagerung der Substanz beruhen, welche sich im Blute befand, weil die verschiedenen Substanzen, welche dem Blute zugesetzt, durch den Magen geströmt werden, in ganz geringer Menge in der Magenwandung fixiert werden. Um die Vermehrung der Milchsäure in der Magenwandung als Folge solcher Erscheinung zu betrachten, war ihre Menge aber, welche sich in der Magenwandung vorfand zu gross. Ausserdem war ihr Gehalt an Milchsäure gegen den des Blutes unverhältnismässig hoch, so dass die Annahme der mechanischen Ablagerung hier gänzlich verfehlt ist. Da andererseits aus dem Untersuchungsergebnisse so weit ganz sicher hervorgeht, dass die Milchsäurebildung aus dem Alanin nicht im Blute, sondern in der Magenwandung selbst stattfindet, kann ohne Zwang angenommen werden, dass die Menge der Milchsäure in den beiden Schichten mit dem chemischen Prozesse der Milchsäurebildung in inniger Beziehung steht. Ist dies der Fall, so muss man annehmen, dass der Vorgang der Milchsäurebildung aus dem *d*-Alanin in den beiden Schichten, bzw. hauptsächlich in der Magenschleimhaut stattfindet, abgesehen von der Frage, in welcher Schicht der Magenwandung das *d*-Alanin desaminiert wurde, obwohl der Prozess nach dem Resultate sicherlich in der Magenwand vor sich geht. Vorläufig möchte ich hier nur bemerken, dass in der Schleimhaut im Hauptversuche fast doppelt soviel Ammoniak-N-Gehalt vorgefunden wurde wie im Kontrollversuche, während es in beiden Versuchen keinen Unterschied zwischen den Gehalt desselben in der Muskelschicht gab. Wenn es anzunehmen erlaubt ist, dass der Ammoniak-N, der sich in der Schleimhaut beim Hauptversuche in vermehrter Menge befand, aus dem *d*-Alanin abgespalten wurde, muss die Schleimhaut als der Hauptort der Desaminierung des Alanins und der Milchsäurebildung aus demselben in der Magenwandung betrachtet werden, weil Ammoniak-N und Milchsäure zum grossen Teil in der Schleimhaut vorgefunden wurden, worüber aber später bei den experimentellen Untersuchungen wieder die Rede sein wird. Der Harnstoff-N wurde im Gegensatz zum Ammoniak hauptsächlich in der Muskelschicht in der Menge von 2,43 mg%, aber in der Schleimhaut nur in der Menge von 0,19 mg% vor-

gefunden. Im Kontrollversuche wurde er in der Muskelschicht nur in der Menge von 0,09 mg% und in der Schleimhaut gar nicht vorgefunden. Dass die Harnstoffbildung im Organismus in der Leber vor sich geht, konnte der umfangreichen Literatur entsprechend nicht bezweifelt werden. Aber über die Frage, ob die Leber der ausschliessliche Ort ist, gibt es viele Untersuchungen, wonach die Fähigkeit, den Harnstoff zu bilden, nicht ein Vorrecht der Leber ist, vielmehr ist es, ebenso wie die Fähigkeit Eiweiss zu verbrennen, eine der allgemeinen Eigenschaften der lebenden Zelle. Wenn auch keine Untersuchung darüber vorliegt, ob der Harnstoff in der Magenwandung synthetisiert wird, ist es bezüglich der Harnstofffrage im Organismus nicht wenig interessant, dass der Harnstoff beim Durchblutungsversuche des Magens mit *d*-Alanin in seiner Muskelschicht sehr vermehrt vorgefunden wurde, ganz ähnlich wie im Durchblutungsversuche der Leber, wo eine erhebliche Harnstoffbildung erzielt wird, wenn Ammoniumsalz und gewisse Aminosäuren dem Blute zugesetzt werden. Auf das Harnstoffproblem in der Magenwandung wird einer meiner Kollegen hier demnächst zurückkommen. Das Alanin, welches während der Durchblutung des Magens verloren ging, betrug durchschnittlich als Aminosäure-N ungefähr 30,43 mg%, u.zw. in der absoluten Menge ungefähr 572 mg, welches theoretisch 573 mg Milchsäure hätte liefern müssen. Es liessen sich jedoch nur 45 mg Milchsäure in Blute, 10 mg in der Muskelschicht und 40 mg in der Schleimhaut, also zusammen 95 mg Milchsäure finden, was nur einem kleinen Teil des verlorenen Alanins entspricht, dessen grösserer Teil bald in der Magenwand fixiert, bald chemisch andersartig umgesetzt werden dürfte.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Wenn der Magen mit *d*-Alanin durchblutet wird, wird das Alanin zum kleinen Teil in Milchsäure, hauptsächlich in der Schleimhaut, umgewandelt und zum grösseren Teil in unbekannter Weise gebunden.
2. Nach Durchblutung des Magens mit *d*-Alanin wird der Ammoniak-N hauptsächlich in der Schleimhaut und der Harn-

Nr.			Blut (mg%)										Magenwand nach der Durchblutung (mg in 100 g)						Bemerkung
Rest-N.		Amino-N.	U-N.		NH ₃ -N.		Milchsäure		Milchsäure		U-N.		NH ₃ -N.						
vor	nach		vor	nach	vor	nach	vor	nach	Muskel- schicht	Schleimhaut- schicht	Muskel- schicht	Schleimhaut- schicht	Muskel- schicht	Schleimhaut- schicht	Muskel- schicht	Schleimhaut- schicht			
1	42.00	39.20	9.91	8.81	5.04	2.80	0.28	2.80	19.80	23.76	72.00	70.20	0	0	2.80	2.80	Ohne Alanin " " "		
2	39.20	36.40	9.80	9.26	5.88	4.20	0.28	2.22	21.12	24.42	75.60	82.80	0.28	0	4.20	3.92			
3	44.80	43.40	10.85	9.77	5.18	3.36	0.42	2.22	17.82	21.78	75.60	68.40	0	0	3.08	3.36			
Durchschnitt	42.00	39.67	10.19	9.28	5.37	3.45	0.33	2.41	19.58	23.32	74.40	73.80	0.09	0	3.36	3.36	Mit d-Alanin, aber ohne Magen		
1	100.80	95.20	57.91	56.72	10.08	9.52	0.28	1.12	17.82	21.78									
2	86.80	84.00	54.92	54.33	9.52	8.96	0.28	0.84	20.46	23.76									
Durchschnitt	93.80	89.60	56.41	55.52	9.80	9.24	0.28	0.98	19.14	22.77							Mit d-Alanin, " " " " " " " " " " " "		
1	91.28	52.64	60.60	29.40	3.92	1.26	0.28	3.08	19.80	34.32	86.40	153.00							
2	95.20	49.84	57.55	24.65	6.02	3.22	0.42	4.06	23.76	43.56	86.40	126.00							
3	81.20	50.96	50.55	23.57	5.04	3.64	0.28	5.60	24.42	40.92	79.20	147.60							
4	95.76	56.58	67.98	29.46	3.36	2.52	0.28	5.60	21.78	42.90	108.00	126.00							
5	89.60	56.00	65.15	27.00	5.88	3.64	0.28	5.60	20.46	35.94	100.80	122.40							
6	88.20	57.40	63.45	27.57	5.18	2.80	0.42	4.48	22.44	40.92	79.20	140.40							
7	92.40	67.20	56.80	30.67	7.84	6.16	0.56	3.36	19.14	36.96	72.00	93.60	2.52	0.28	4.76	9.52			
8	86.80	61.60	53.46	28.44	8.26	4.76	0.42	3.36	20.46	40.92	108.00	136.80	1.40	0	3.64	6.44			
9	92.40	64.40	50.31	29.25	14.56	5.88	0.28	4.48	9.90	30.36	72.00	108.00	3.36	0.28	3.08	5.88			
Durchschnitt	90.32	57.40	58.43	28.00	6.67	3.75	0.36	4.40	20.24	38.53	88.00	128.20	2.43	0.19	3.83	7.28			

stoff-N in der Muskelschicht sehr vermehrt vorgefunden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zur Durchblutung wurde Hundemagen gebraucht. Im I. Kontrollversuche wurde der Magen mit Blut ohne Hinzufügung von Alanin einen bestimmten Zeitraum, wie in Hauptversuche, durchströmt. Im II. Kontrollversuche wurde das Blut mit *d*-Alanin aber ohne Magen nur durch den Aparat so lange, wie im Hauptversuche, circuliert. Im Hauptversuche wurde der Magen mit dem Blute, welchem 1 g *d*-Alanin hinzugefügt wurde, 3 Stunden nach M. Nakagawa durchströmt. Amino-N wurde nach Van Slyke, Harnstoff- und Ammoniak-N nach Van Slyke und Cullan und Milchsäure nach Tanaka und Endo bestimmt.

LITERATUR.

- Borstein (1929): Bioch. Zeitschr., **374**, 214.
Ellinger (1910): Handb. d. Bioch., **3 I**, 563.
Haarmann (1932): Bioch. Zeitschr., **103**, 255.
Ikeda.
Jacoby, M. (1902): Ergebnis d. Physiol., **1**, 532.
Levy, A. M. Noorden (1906): Handb. d. Pathol. d. Stoffwech., **1**, 99.
Matsuoka (1933): The journal of biochemistry, **17**, 2.
Löffler, W. (1916): Bioch. Zeitschr., **76**, 55.
Weiland, E. Nagels (1907): Hanb. d. Physiol., **2**, 481.
Wohlgemuth, J. (1910): Handb. d. Bioch. **3 I**, 183.

DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsuji.)

VI. Mitteilung.

Urikolytischer Prozess in der Magenwandung.

VON

TATSUHACHIRO TSUTSUI.

(Aus der Inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Nippon.)

(Eingegangen am 22. Oktober 1934)

1931 teilte Inatsugu mit, dass Harnsäure und Allantoin im tierischen sowie im menschlichen reinen Magensaft als normale Bestandteile desselben immer enthalten sind. Während der Wert der Harnsäure sich damals nur gering erwies, wurde das Allantoin in einer beträchtlich grossen Menge vorgefunden. Dieser Befund muss im Problem des Purinstoffwechsels wesentlich beachtet werden. Besonders erregt unsere Aufmerksamkeit die experimentelle Tatsache, dass wenn harnsaures Salz am Kleinhund intravenös injiziert wurde, der Wert des Allantoin im Magensaft beträchtlich aufstieg und ausserdem diese Erscheinung nach Darreichung der Harnsäure 3 Tage dauerte mit Neigung in Menge allmählich zuzunehmen. Wirklich wird, wie Inatsugu ausdrückte, wenn die Tagesmenge des Magensaftes nach Carlson 1,5 lit. beträgt, die totale Menge des Allantoin des Magensaftes in einem Tage eine grosse Menge erreichen. Also muss das Allantoin, welches im Magensaft sich vorfindet, ohne weiteres für das Studium des Purinstoffwechsels des Organismus eine wichtige Stellung einnehmen. Abgesehen davon, möchte ich aber zuerst einmal und vor allem überlegen, im welchem Teil des Körpers das Allantoin, welches im Magensaft sich vorfand, aus der injizierten Harnsäure gebildet wurde.

Dass die Harnsäure in der Hundeleber zersetzt wird, um Allantoin zu bilden, wurde von Pohl (1902) durch Autolysenversuche und von Schittenhelm und Chrometzka (1925) durch

Durchblutungsversuche nachgewiesen.

Aber dass dies nicht etwa ausschließlich in der Leber geschieht, bewiesen die Untersuchungen am Hunde mit Eck's Fistel Abderhalden, London und Schittenhelm(1909). Also muss das Allantoin, welches im Magensaft sich vorfindet, nur ein Teil des ges. Allantoin sein, welches irgendwo an beliebigen Stellen im Organismus aus der injizierten Harnsäure oxydiert wurde. Wenn das Allantoin, welches im Magensaft sich vorfindet, mit dem circulierenden Blute zum Magen transportiert wurde, welches natürlich mit der noch unzersetzt bleibenden Harnsäure gesättigt sein muss, darf man annehmen, dass nicht nur das Allantoin, sondern auch die Harnsäure reichlich in den Magen ausgeschieden werden sollten, was jedoch mit der Harnsäure nicht der Fall war. Schon lange wissen wir aber, dass der endogene Anteil der Harnpurine vom Zellkernzerfall in den Geweben, vom erhöhten Stoffwechsel des Organismus und von der gesteigerten Tätigkeit der Verdauungsdrüsen u.s.w. her stammt. Also darf man vermuten, dass die Umsetzung der Harnsäure in Allantoin physiologisch auch in der Schleimhaut des Magens vollzogen werden kann. Zum Studium des Purinstoffwechsels wurde der Tiermagen (Meerschweinchen) mit seinem Inhalt zusammen auf die Harnsäure, welche vorher dem Tiere intravenös dargereicht wurde, von Burgusch und Rother mit Erfolg untersucht, um zur Kenntniss vom Deficit der Harnsäure in der Purinstoffwechseluntersuchung beizutragen (1925). Diese Harnsäure, welche durch den Blutweg in die Magenwand transportiert wurde, muss ohne weiteres in Allantoin umgesetzt werden, wenn die endogenen Harnpurine der Tiere in der Magenwandung gebildet werden. Wenn dies der Fall, ist es leicht verständlich, dass das in der Magenwandung gebildete Allantoin im Magensaft sich vorfindet, da es sehr viele Analogien gibt. Nämlich wenn man den Hundemagen mit *d*-Alanin durchblutet, wird *d*-Milchsäure als Desaminierungsprodukt des Alanins nicht nur im Blute, sondern auch im Magensaft vorgefunden (1933). Beim Versuch mit *l*-Leucin wird der Acetonkörper als dessen Zersetzungsprodukt immer im Blute sowie im Magensaft nachgewiesen(1933). Dabei werden gewöhnlich die ausgegangenen

Substanzen selbst nur in geringer Menge im Magensaft vorgefunden, dagegen die Abbauprodukte verhältnissmässig reichlich.

Also darf ohne Zwang angenommen werden, dass das Allantoin in der Magenschleimhaut aus der Harnsäure entstand, welche am Kleinmagenhunde intravenös dargereicht wurde, und dann das neugebildete Allantoin reichlich durch die sekretorische Tätigkeit der Drüsenzellen im Magensaft sich vorfand, wenn der urykolitische Vorgang wirklich in der Magenwand vor sich geht, was ich ja hier zum Studium der chemischen Vorgänge in der Magenwandung durch die Durchblutungsversuche bestätigen will.

In meinen Versuchsreihen wurden nicht nur Blut und Mageninhalt, sondern auch Magenschleimhaut auf Harnsäure sowie auf Allantoin untersucht, weil der chemische Prozess zwischen Harnsäure und Allantoin vermutlich in der Magenschleimhaut stattfinden darf. Im tierischen Blute wurden das Allantoin in geringer Menge von And. Hunter krystallinisch schon nach-Harnsäure und Allantoin in der Magenschleimhaut normal enthalten sind.

Im nüchternen Zustand fand ich im Hundeblute das Allantoin auf 16,8 mg% im Durchschnitt und die Harnsäure normaler Weise nur eine Spur. In der Magenschleimhaut des Hundes, welche mit stumpfem Messer von der Muskelschicht abgeschabt, zur Untersuchung gebracht wurde, fand ich 23,3 mg% Allantoin und 0,5 mg Harnsäure im Durchschnitt. (Tabelle I.)

Durch Untersuchung der Organbreiautolyse wurde schon genau festgestellt, dass die verschiedenen Organe Fermente enthalten, welche aus den Substanzen der höheren Reihe des Purinkörpers die Harnsäure und aus derselben das Allantoin bilden (1925). Ob die Fermente in der Magenschleimhaut existieren, ist niemals untersucht worden. Blut und Magenschleimhaut des Hundes wurden in den Brutschrank gebracht und nach 3 Stunden auf die beiden Substanzen untersucht. Im Blute fand ich 22,0 mg% Allantoin und nur eine Spur Harnsäure. In der Schleimhaut fand ich 67,3 mg% Allantoin und 0,5 mg% Harnsäure. Ich beobachtete nämlich, dass das Allantoin in der Magenschleim-

haut durch die Autodigestion in seiner Menge deutlich zunahm, während die Menge der Harnsäure sich nicht wesentlich veränderte. Wenn das Allantoin aus der Harnsäure umgesetzt wird, muss man annehmen, dass der Vorgang in der Magenschleimhaut stattfindet, wodurch der Purinkörper über die Harnsäure bis zum Allantoin gespalten wird. (Tabelle II.)

Diesmal durchströmte ich den Magen bloss mit dem Blute 3 Stunden.

Nach der Durchblutung wurde 24,8 mg% Allantoin im Blute, 38,1 mg% im Magensaft, welcher während der Durchblutung sezerniert wurde, und 82,7 mg% in der Magenschleimhaut vorgefunden. Die Harnsäure im Blute sowie im Magensaft wurde nur spurenweise nachgewiesen, aber in der Schleimhaut wurden 1,8 mg vorgefunden. In diesen Versuchen ist es merkwürdig, dass sich das Allantoin im Magensaft sehr viel und in der Schleimhaut ausgezeichnet reichlich vorfand, und die Harnsäure in der Schleimhaut fast 3-fach so viel, wie normal nachgewiesen wurde. (Tabelle III.)

Nach den 2 letzteren Versuchen ist es sicher, dass nicht nur das Allantoin, sondern auch die Harnsäure in der Magenschleimhaut gebildet wird. Als Bedingung, wodurch der Vorgang sich lebhaft manifestieren lässt, ist die Durchblutung viel besser geeignet als die Autodigestion. In den beiden Untersuchungen ist es sehr bemerkenswert, dass die Menge der Harnsäure in der Schleimhaut sowie im Magensaft im Vergleich zum Allantoin sehr gering ist. Wegen dieser Tatsache muss die urykolitische Wirkung in der Magenschleimhaut höchst wahrscheinlich sehr kräftig sein, wenn die Allantoinbildung über die Harnsäure stattfindet. Um das Verhalten noch klarer festzustellen, untersuchte ich das Schicksal der Harnsäure, welche dem durchströmenden Blute hinzugefügt wurde. Zu diesem Zweck wurden 500,0 mg der Harnsäure in 0,4%iger Lithiumcarbonatlösung gelöst, dem Blute zugegossen und durchgeströmt.

Nach der Durchblutung fand ich im Blute das Allantoin in der absoluten Menge von 210,1 mg u.zw. auf 69,0 mg% vor und die Harnsäure auf 292,2 mg zurück, und im Magensaft das

Allantoin in der absoluten Menge von 156,9 mg u.zw. auf 189,3 mg% und die Harnsäure 3,5 mg im Durchschnitt vor, während die Quantitäten in der Substanz in den einzelnen Versuchen sehr schwankend waren.

In den Versuchen ging die Harnsäure durchschnittlich ungefähr auf 207,8 mg im Blute verloren, deren Bruchteil ganz gering u.zw. 6,1 mg zusammen im Magensaft und in der Schleimhaut sich vorfand, indem das Resultat im Durchblutungsversuche ohne Harnsäurebelastung in die Rechnung gesetzt wurde. Andererseits wurde das Allantoin im Blute, im Magensaft sowie in der Schleimhaut in beträchtlicher Menge u.zw. zusammen in der Menge von 392,9 mg vorgefunden, aber die Menge des Allantoins, welches wirklich durch Harnsäurebelastung selbst gebildet wurde, war 221,1 mg, weil das Allantoin im Blute, im Magensaft sowie in der Schleimhaut im Versuche ohne Hinzufügung der Harnsäure zusammen 171,0 mg betrug. Wenn man annehmen kann, dass die verschwundene Harnsäure sämtlich in Allantoin ungewandelt wurde, müsste sich das Allantoin auf 189,4 mg belaufen, während es in Wirklichkeit in der Menge ungefähr auf 221,9 mg vorgefunden wurde. Warum das geschah, ist kaum erklärbar. Wenn mir aber eine Überlegung erlaubt ist, so beruht es höchst wahrscheinlich darauf, dass die Zersetzung der Nukleinsubstanzen in der Mangenschleimhaut infolge der Belastung der Harnsäure durch die lebhafteste Tätigkeit des Magens stattfindet. Auf jeden Fall ist es sicher, dass die Harnsäure in der Mangenschleimhaut in Allantoin ungewandelt wird.

Der Befund von Inatsugu, dass die Ausscheidung des Allantoins nach intravenöser Darreichung von Harnsäure im Magensaft 3 Tage protrahierte, ist ganz verständlich, wenn man sieht, wie reichlich das Allantoin in der Mangenschleimhaut abgelagert ist.

Die Schlussfolgerung ist also, dass ein lebhafter urykolytischer Vorgang in der Mangenschleimhaut vor sich geht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Für die Experimente wurden Hunde gebraucht.

I.

*Normaler Gehalt von Harnsäure und Allantoin im Blute
und in der Magenschleimhaut.*

Die Harnsäure des Blutes wurde nach And. Harpuder (1923) und das Allantoin nach Wieckowski (1913) bestimmt. Die Schleimhaut des Magens wurde mit stumpfem Messer von der Muskelschicht abgeschabt, mit der Schere klein zerschnitten und in kochendem Wasser energisch extrahiert, mit Tuch koliert. Das Kolat wurde mit Phosphorwolframsäurelösung enteiwisst, filtriert. Das Filtrat wurde mit Bleioxyd gefällt, filtriert und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert und das Filtrat unter verminderten Druck in eine bestimmte Menge eingengt. Das Filtrat wurde auf Harnsäure und Allantoin untersucht, ebenso wie das Blut.

TABELLE I. Kontrollversuche.

Harnsäure und Allantoin im Blute sowie in der Schleimhaut.

Nr.	Datum	Blutmenge (ccm)	Blut			Schleimhaut			
			Allantoin		Harnsäure	Gewicht	Allantoin		Harnsäure
			Mg	Mg %			Mg	Mg %	
1.	23/XI	300	52,1	17,3	Spur	58	6,32	24,3	0,6
2.	30/ „	300	49,1	16,3	Spur	60	6,72	22,4	0,4
Durchschnitt			50,6	16,8	Spur		6,52	23,3	0,5

II.

Autodigestionsversuche.

Das Blut und die Magenschleimhaut standen 3 Stunden im Brutschrank. Die Bestimmungsmethode war dieselbe wie bei den früheren Versuchen.

TABELLE II.

Hauptversuch I. Autodigestionsversuche.

Das Blut und die Magenschleimhaut standen 3 Stunden im Brutschrank.

Nr.	Datum	Blutmenge (ccm)	Harnsäure (Mg)	Blutschrank (St)	Temperatur (°C)	Blut			Schleimhaut			
						Allantoin		Harnsäure	Gewicht	Allantoin		Harnsäure
						Mg	Mg%	Mg		Mg	Mg%	Mg
1.	20/V	300	0	3	37	60,0	20,0	Spur	48	25,2	52,6	0,8
2.	29/ „	300	0	3	37	90,0	30,0	Spur	44	28,4	60,0	0,6
3.	22/XII	300	0	3	37	74,0	24,6	Spur	51	30,2	60,4	0,4
4.	27/ „	300	0	3	37	67,9	22,6	Spur	35	27,3	72,2	0,7
5.	6/I	300	0	3	37	37,9	12,8	Spur	19	17,3	91,5	0,4
Durchschnitt						56,9	22,0	Spur		25,6	67,3	0,5

III.

Durchblutungsversuche des Magens ohne Hinzufügung von Harnsäure.

Die Durchblutungsmethode des Magens geschah ganz genau nach Y. Yoshida und Y. Matsuoka. Die Durchblutung dauerte 3 Stunden. Nach der Durchblutung wurden Blut, Magenschleimhaut und Magensaft auf Harnsäure und Allantoin untersucht.

IV.

Durchblutungsversuche des Magens mit Harnsäure.

500,0 mg der Harnsäure wurden in 0,4%iger Lithiumcarbonatlösung gelöst und dem durchströmenden Blute eingegossen. Die Durchströmung dauerte 3 Stunden. Nach der Durchblutung wurden Blut, Magenschleimhaut und Magensaft auf Harnsäure und Allantoin untersucht.

Zum Schluss fühle ich mich verpflichtet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. M. Tsudji, und Herrn Docent Dr. Y. Sendju meinen herzlichen Dank für ihre überaus freundliche Leitung auszusprechen.

TABELLE IV. Hauptversuch III.
Durchblutungsversuche des Magens, in denen eine bestimmte Menge
Harnsäure dem Blute hinzugefügt wurde.

Nr.	Datum	Blutmenge (c.c.)	Harnsäure (Mg)	Durchblutungs- dauer (St)	Druck (Hg m)	Blut			Magensaft			Schleimbaut		
						Allantoin	Harnsäure	Menge	Allantoin	Harnsäure	Gewicht	Allantoin	Harnsäure	
						Mg	Mg%	c.c.	Mg	Mg%	G	Mg	Mg%	Mg
1.	6/III	300	500	3	20-23	173,5	59,5	38	12,6	33,2	67	238,0	355,3	2,1
2.	22/IV	300	500	3	20-22	199,0	66,3	40	25,2	63,2	83	200,6	211,7	2,7
3.	1/V	300	500	3	20-24	251,2	83,7	30	42,6	142,2	92	88,4	93,1	Spur
4.	6/„	300	500	3	20-25	173,8	57,9	30	12,6	42,1	167	140,6	84,1	5,3
5.	13/„	300	500	3	20-24	248,0	82,6	20	36,3	181,7	69	116,6	169,4	4,1
Durchschnitt						210,1	69,0		25,9	92,4		156,9	189,3	3,5

LITERATUR.

- Abderhalden, London, Schittenhelm (1909): *Zeitschr. f. physiolog. Chem.* **61**, 490.
- Brugsch (1922): *Klin. Wochenschr.*, Nr. 30, 1495; Nr. 35, 1729.
- Brugsch, Rother (1925): *Zeitschr. f. physiolog. Chem.* **143**, 48.
- Carlson (1915): *Americ. journ. of physiolog.*, **38**, 266.
- Folin, O., Bergland, H. and Berick, C. (1924): *The Journ. of biolog. Chem.* **60**, 361.
- Harpuder (1923): *Zeitschr. f. d. gesamt. exp. med.*, **32**, 378.
- Ikebe, K. (1933): *The Jour. of biochemistry*, **17**, 2.
- Inatsugu, Y. (1931): *The Jour. of biochemistry*, **13**, 1.
- Matsuoka, Y. (1933): *The Jour. of biochemistry*, **17**, 2.
- Pohl (1902): *Arsch. f. exp. Patholog.*, **48**, 367.
- Schittenhelm (1905): *Zeitschr. f. physiolog. Chem.*, **45**, 161.
- Schittenhelm, Chrometzka (1925): *Vgl. Handbuch der Biochemie*, **8**, 589.
- Schittenhelm, Harpuder (1925): *Handbuch der Biochemie*, **8**, 583.
- Wieckowski: *Neubauer-Huppert. Analyse des Harns*, **2**, 1076.
- Yoshimura, S.: *Nagasaki Igakukaizasshi*, **7**, 5, 740.

DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsuji.)

VII. Mitteilung.

Ueber die Vorgänge der Acetonkörperbildung in der Magenwand.

VON

NAGAO TSURU.

(Aus der Inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Nippon.)

(Eingegangen am 22. Oktober 1934)

Beim Studium der Fettsäuren des Magensaftes entdeckte mein College K. Ikebe Acetonkörper immer als einen normalen Bestandteil desselben. Im weiteren Laufe der Forschung über die Herkunft des Acetonkörpers des Magensaftes stellte er fest, dass das *l*-Leucin in der Magenwand abgebaut wird, um den Acetonkörper zu bilden, welcher sich teilweise auch im Magensaft vorfand. Durch die klinischen Untersuchungen von Baer, K. u. Blum, L. (1906, 1908 u. 1910) sowie die experimentellen von Embden, G. u. Marx, A. (1908) ist das Leucin schon als befähigt erkannt worden, im Organismus, besonders in der Leber, als Quelle der Acetonkörper zu dienen. Aber in der Lehre der Fettspaltung im Organismus wurde es durch viele Beobachtungen schon sichergestellt, dass die Zufuhr von Buttersäure und Kapronsäure an diabetische Menschen und Tiere die Acetonkörperausscheidung steigert (Strauss, H. u. Philipson (1900), Loeb, A. (1902), u. Schwarz, L. (1903). Hinsichtlich des Chemismus der Acetonkörperbildung aus Fettsäuren wurde aus der Untersuchung von Knoop (1905) einerseits und aus denjenigen von Embden und seinen Mitarbeitern (1906) anderseits klar nachgewiesen, dass der Abbau gesättigter aliphatischer Fettsäuren im tierischen Organismus nach Oxydation am β -Kohlenstoff unter Abspaltung von je 2 Kohlenstoffatomen vom Carboxylende her sich vollzieht. Falls der Vorgang sich wirklich in der beschriebenen Art abspielt,

muss das Aceton nur aus den Fettsäuren mit gerader C-Atomzahl gebildet werden, und können wir von den Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen ja niemals zur β -Oxybuttersäure u.zw. zum Aceton gelangen.

Diese Anschauung hat durch Durchblutungsversuche mit überlebender Hundeleber ausserordentlich an Wahrscheinlichkeit gewonnen. Wenn der Acetonkörper wirklich in der Magenwand gebildet wird, ebenso wie in der Leber, so muss der Körper nicht nur aus Leucin, sondern vermutlich ja mehr aus der Fettsäuren herkommen. Um zu prüfen, ob ein Vorgang dieser Art wirklich in der Magenschleimhaut vorkommt, nahm ich Durchblutungsversuche des Hundemagens mit Fettsäuren vor, bald mit einer geraden, bald mit einer ungeraden Anzahl von C-Atomen: das dabei festgestellte chemische Verhalten der Fettsäuren kann für das weitere Studium des Chemismus in der Magenwand als Grundlage dienen.

Experimenteller Teil.

Zum Versuche wurde Hundemagen gebraucht. Die Durchströmung dauerte 3 Stunden. Die Durchblutungsmethode entsprach ganz genau der von Yoschida (1933). Aceton, Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure wurden nach der Mikrobestimmungsmethode von Takahata und Kume untersucht. Ausserdem wurden Aceton und Acetessigsäure nach Huppert-Messinger und β -Oxybuttersäure nach Schaffer-Mariot makrobestimmt, um die Resultate noch sicherer zu bestätigen.

KONTROLLVERSUCHE.

Das Blut, welchem keine Fettsäure hinzugefügt war, wurde durch die Magenwand durchgeströmt. Wenn man den Acetonkörper im Blute nach der Durchströmung mit dem Vorblute vergleicht, bleiben Aceton und β -Oxybuttersäure in beiden Flüssigkeiten unverändert, wogegen sich der Wert der Acetessigsäure von 14,85 mg% nach Durchströmung bis 5,28 mg% verminderte. Der Wert des gesamten Aceton, wobei Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure in Aceton umgerechnet wurde, stieg von 12,95 mg% im

TABELLE I. (Kontrollversuche).

(A) Mikrobestimmung

		Aceton (im mg%)	Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
1.	Vorblut	2,73	14,66	0,97	11,61
	Nachblut	2,39	3,16	0,55	5,20
2.	Vorblut	2,10	14,44	0,27	10,51
	Nachblut	1,83	3,54	1,39	4,66
3.	Vorblut	1,82	1,20	5,41	5,52
	Nachblut	1,70	0,85	4,44	4,69
4.	Vorblut	3,41	20,50	7,08	19,02
	Nachblut	1,53	6,58	5,83	8,47
5.	Vorblut	1,70	23,46	8,95	18,12
	Nachblut	3,66	12,28	10,00	16,23
	Durchschnitt.				
	Vorblut	2,35	14,85	4,53	12,95
	Nachblut	2,22	5,28	4,44	7,85

(B) Makrobestimmung

	Aceton u. Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
Vorblut	3,77	5,21	6,68
Nachblut	1,62	3,47	3,36

Vorblute bis 7,85 mg% im Nachblute ab. In der Makrobestimmungsmethode beobachtete ich, dass durch die Durchblutung Aceton und Acetessigsäure von 3,77 mg% bis 1,62 mg% und β -Oxybuttersäure von 5,21 mg% bis 3,47 mg% u.zw. das Gesamtaceton von 6,68 mg% bis 3,56 mg% herabgesetzt wurden. Es ging nämlich der Acetonkörper, besonders die Acetessigsäure in gewöhnliche Blute, durch die Durchblutung deutlich verloren.

HAUPTVERSUCHE.

I. Durchblutungsversuche mit Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen.

1. Buttersäure (C₄).

1 g Buttersäure wurde mit Natriumcarbonatlösung neutral-

TABELLE II. (Buttersäure)

(A) Mikrobestimmung

		Aceton (im mg%)	Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
1.	Vorblut	1,91	4,41	10,28	10,13
	Nachblut	1,10	27,25	5,28	19,37
2.	Vorblut	3,58	0,00	1,66	4,50
	Nachblut	3,41	6,41	2,08	8,24
3.	Vorblut	2,98	0,00	4,16	4,45
	Nachblut	1,87	2,87	2,56	4,37
4.	Vorblut	2,27	7,08	5,41	9,30
	Nachblut	2,94	12,10	2,91	11,45
5.	Vorblut	2,44	0,00	6,55	5,01
	Nachblut	2,02	2,44	4,29	5,60
	Durchschnitt.				
	Vorblut	2,63	2,29	5,61	6,68
	Nachblut	2,44	10,21	3,42	9,81

(B) Makrobestimmung

	Aceton u. Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
Vorblut	1,01	3,49	2,96
Nachblut	2,41	2,75	3,94

siert, und dem durchströmenden Blute zugesetzt. Durch die Durchblutung des Magens wurde die Menge des Acetons nur wenig, die der β -Oxybuttersäure aber deutlich im Blute vermindert vorgefunden. Da aber Acetessigsäure von 2,29 mg% im Vorblute bis 10,21 mg% im Nachblute aufstieg, wurde der Wert als gesamtes Aceton, indem β -Oxybuttersäure und Acetessigsäure in Aceton umgerechnet wurde, von 6,68 mg% bis 9,81 mg% gesteigert vorgefunden. In der Makrobestimmung stieg der Wert des gesamten Acetons im Blute nach der Durchblutung deutlich auf.

2. Kapronsäure (C_6).

1 g Kapronsäure wurde neutralisiert und dem Blute zugesetzt. In diesem Versuche wurde nach Durchblutung die Menge des Acetons im Blute vermindert, aber die der anderen Substanzen,

TABELLE III. (Capronsäure)

(A) Mikrobestimmung

		Aceton (im mg%)	Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesamt. Aceton (im mg%)
1.	Vorblut	1,29	0,00	1,66	2,22
	Nachblut	0,34	3,05	0,69	2,46
2.	Vorblut	2,96	4,76	3,30	7,50
	Nachblut	1,54	9,36	6,60	10,55
3.	Vorblut	2,84	3,90	2,22	6,30
	Nachblut	1,98	3,90	3,60	6,20
4.	Vorblut	2,21	6,47	1,39	7,10
	Nachblut	1,93	10,87	1,39	9,70
5.	Vorblut	2,81	10,50	2,76	6,60
	Nachblut	1,80	13,44	5,69	11,49
	Durchschnitt.				
	Vorblut	2,43	5,12	2,26	5,94
	Nachblut	1,52	8,12	3,59	8,08

(B) Makrobestimmung

	Aceton u. Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesamt. Aceton (im mg%)
Vorblut	0,55	13,47	8,07
Nachblut	1,25	14,64	9,42

mitunter der Acetessigsäure, sehr vermehrt vorgefunden. Der Wert des gesamten Acetons stieg von 5,94 mg% im Vorblute bis 8,08 mg% im Nachblute auf. In der Makrobestimmung wurden Aceton und Acetessigsäure, β -Oxybuttersäure und das gesamte Aceton mehr im Nachblute als im Vorblute vorgefunden.

3. Kaprylsäure (C_8).

1 g Kaprylsäure wurde neutralisiert und dem Blute zugesetzt. In diesen Versuchen mit Ausnahme vom 3. und 5., in welchen die chemischen Vorgänge wie im Kontrollversuche verliefen, wurden Aceton, Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure, insbesondere Acetessigsäure im Nachblute, deutlich mehr als im Vorblute vorgefunden. Das gesamte Aceton, indem die Resultate im 3. und 5. Versuche in Rechnung gezogen wurden, stieg durch Durchblutung von 9,23

TABELLE IV. (Caprylsäure)

(A) Mikrobestimmung

		Aceton (im mg%)	Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesamt. Aceton (im mg%)
1.	Vorblut	2,88	16,02	2,77	13,54
	Nachblut	10,24	13,57	3,33	19,81
2.	Vorblut	1,42	2,44	1,11	3,19
	Nachblut	2,16	9,77	2,91	9,35
3.	Vorblut	3,30	15,21	10,41	17,96
	Nachblut	7,38	2,68	2,70	10,71
4.	Vorblut	1,93	1,22	0,88	3,39
	Nachblut	7,05	12,22	1,13	14,63
5.	Vorblut	6,67	2,08	0,39	8,07
	Nachblut	1,63	0,25	0,25	1,91
	Durchschnitt.				
	Vorblut	3,24	7,39	3,11	9,23
	Nachblut	5,69	7,69	2,06	11,23

(B) Makrobestimmung

	Aceton u. Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesamt. Aceton (im mg%)
Vorblut	1,39	0,59	1,73
Nachblut	2,46	0,42	2,69

mg% bis 11,23 mg% auf. In der Makrobestimmung wurde das gesamte Aceton mehr im Nachblute als im Vorblute vorgefunden.

4. Kaprinsäure (C₁₀).

1 g Kaprinsäure wurde neutralisiert und dem Blute zugesetzt. Durch die Durchblutung fand sich die Menge des Acetons unverändert und die der β -Oxybuttersäure etwas vermindert im Blute vor, wogegen die der Acetessigsäure sehr vermehrt u.zw. fast doppelt so viel wie im Vorblute vorgefunden wurde. Der gesamte Acetonwert im Blute stieg von 17,22 mg% nach der Durchblutung bis 24,46 mg% auf. In der Makrobestimmung, während die Menge der β -Oxybuttersäure durch die Durchblutung im Blute unverändert war, stieg aber das Aceton von 4,43 mg% bis 11,77 mg% bzw. das gesamte Aceton von 6,48 mg% bis 13,81 mg% auf.

TABELLE V. (Caprinsäure)

(A) Mikrobestimmung

		Aceton (im mg%)	Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
1.	Vorblut	15,18	11,36	3,12	23,37
	Nachblut	5,66	50,60	1,00	34,99
2.	Vorblut	2,26	6,93	0,54	6,51
	Nachblut	1,87	18,18	0,41	12,42
3.	Vorblut	1,87	22,00	10,83	20,42
	Nachblut	3,41	41,80	10,83	33,22
4.	Vorblut	0,51	15,21	16,54	18,37
	Nachblut	2,04	18,15	16,54	21,58
5.	Vorblut	3,07	18,33	7,08	17,44
	Nachblut	9,04	16,66	2,91	20,13
	Durchschnitt.				
	Vorblut	4,56	16,76	7,62	17,22
	Nachblut	4,40	29,07	6,33	24,46

(B) Makrobestimmung

	Aceton u. Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
Vorblut	4,43	3,66	6,48
Nachblut	11,77	3,66	13,81

II. Durchblutungsversuche mit Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen.

5. Valeriansäure (C₅).

1 g Valerinsäure wurde neutralisiert, und dem Blute zugesetzt. Durch die Durchblutung des Magens verminderte sich der Acetonkörper im Blute mit Ausnahme von β -Oxybuttersäure, welche im durchschnittlichen Werte im Nachblute etwas höher als im Vorblute vorgefunden wurde. Aber das gesamte Aceton im Blute stieg von 14,47 mg% nach der Durchblutung bis 10,54 mg% ab. In der Makrobestimmung blieben sämtliche Substanzen, bzw. das gesamte Aceton im Blute, durch Durchblutung in ihrer Menge unverändert.

TABELLE VI. (Valeriansäure)

(A) Mikrobestimmung

		Aceton (im mg%)	Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesamt. Aceton (im mg%)
1.	Vorblut	2,27	9,04	0,25	7,54
	Nachblut	2,27	8,92	1,37	8,11
2.	Vorblut	1,92	8,06	2,30	7,81
	Nachblut	1,82	8,04	3,30	8,23
3.	Vorblut	2,81	3,17	1,60	5,53
	Nachblut	2,73	1,00	3,00	4,40
4.	Vorblut	9,47	21,81	12,83	29,03
	Nachblut	6,14	5,13	9,37	14,28
5.	Vorblut	3,49	21,08	12,50	22,45
	Nachblut	4,26	11,46	13,33	18,20
	Durchschnitt.				
	Vorblut	3,99	12,63	5,89	14,47
	Nachblut	3,44	6,71	6,07	10,64

(B) Makrobestimmung

	Aceton u. Acetessig- säure(im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesamt. Aceton (im mg%)
Vorblut	0,36	12,83	7,45
Nachblut	0,38	13,30	7,80

6. Heptylsäure (C_7).

1 g Heptylsäure wurde neutralisiert und dem Blute zugesetzt. Durch die Durchblutung des Magens zeigten Aceton, Acetessigsäure, β -Oxybuttersäure und das gesamte Aceton im Blute in ihrer Menge keine Veränderung. In der Makrobestimmung, während die Fraktion von Aceton und Acetessigsäure im Blute sich nach der Durchblutung in der Menge etwas vermehrte, stieg der Wert als gesamtes Aceton von 14,42 mg% bis 9,79 mg% ab, da die Menge der β -Oxybuttersäure beträchtlich abnahm.

7. Nonylsäure (C_9).

1 g Nonylsäure wurde neutralisiert und dem Blute zugesetzt. Durch die Durchblutung des Magens verminderten sich Aceton,

TABELLE VII. (Heptylsäure)

(A) Mikrobestimmung

		Aceton (im mg%)	Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
1.	Vorblut	4,09	6,35	6,11	10,91
	Nachblut	3,52	4,80	6,14	9,68
2.	Vorblut	4,09	6,47	2,50	8,17
	Nachblut	4,32	3,02	3,61	8,05
3.	Vorblut	30,34	30,61	6,45	51,33
	Nachblut	28,84	31,66	7,08	50,78
4.	Vorblut	4,36	13,00	20,00	22,91
	Nachblut	5,04	16,86	16,04	23,74
5.	Vorblut	2,84	6,35	12,83	13,60
	Nachblut	2,73	6,93	9,37	11,89
	Durchschnitt.				
	Vorblut	9,14	12,55	9,57	21,38
	Nachblut	8,89	12,65	8,44	20,82

(B) Makrobestimmung

	Aceton u. Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
Vorblut	4,19	18,33	14,42
Nachblut	6,51	5,88	9,79

Acetessigsäure, β -oxybuttersäure und das gesamte Aceton in ihrer Menge im Blute, aber in der Makrobestimmung zeigten sie in ihrer Menge keine Veränderung.

SCHLUSSBETRACHTUNG.

Durch die Durchblutung des Magens nur mit Blut wurde der Acetonkörper in seiner Verteilung im Blute stark beeinflusst. Die dadurch hervorgerufene Veränderung im Mengenverhältnis der einzelnen Substanzen des Acetonkörpers war nicht immer gleichartig in den einzelnen Versuchen, doch war es soweit immer eine regelmässige Erscheinung, dass sich die Acetessigsäure und das gesamte Aceton nach der Durchblutung im Blute in ihrer Menge deutlich verminderten. Also scheint der Acetonkörper in der Magenwand einerseits abgebaut, aber anderseits aus einer Mutter-

TABELLE VIII. (Nonylsäure)

(A) Mikrobestimmung

		Aceton (im mg%)	Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
1.	Vorblut	3,77	10,81	7,91	14,32
	Nachblut	1,88	2,93	6,25	7,02
2.	Vorblut	5,09	9,71	7,08	14,57
	Nachblut	4,09	4,40	6,66	10,31
3.	Vorblut	2,73	8,61	5,00	10,40
	Nachblut	3,92	4,16	3,12	8,65
4.	Vorblut	11,77	22,18	8,56	29,15
	Nachblut	4,93	29,33	7,50	25,79
5.	Vorblut	12,88	11,00	9,37	24,36
	Nachblut	11,43	3,66	9,58	18,85
	Durchschnitt.				
	Vorblut	7,24	12,46	7,58	18,58
	Nachblut	5,25	8,89	6,62	13,72

(B) Makrobestimmung

	Aceton u. Acetessig- säure (im mg%)	β -Oxybutter- säure (im mg%)	gesammt. Aceton (im mg%)
Vorblut	3,32	11,14	9,54
Nachblut	3,26	11,14	9,47

substanz neugebildet zu werden, als welche Leucin schon von Ikebe experimentell mit Erfolg festgestellt wurde. Aber nach meiner Meinung ist das Leucin nicht die einzige Substanz, welche in der Magenwand den Acetonkörper liefert, sondern es müssen die Fettsäuren auch, ja sogar mehr daran beteiligt sein, weil sie im allgemeinen als die Quelle des Acetonkörpers im Organismus schon bekannt sind. Tatsächlich konnte ich im Durchblutungsversuche des Magens nachweisen, dass die Fettsäuren mit hohen Molekülen in der Magenwand in Acetonkörper umgewandelt werden. Als Ergebnis der Untersuchung war es sehr merkwürdig, dass nur Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen den Acetonkörper lieferten, wogegen im Versuche mit Fettsäuren mit ungerader Anzahl von C-Atomen niemals Acetonbildung beobachtet wurde:

es wurde nämlich die Menge des gesamten Acetons durch die Durchblutung im letzteren nicht, aber im ersteren immer, besonders im Versuche mit Kaprinsäure, beträchtlich vermehrt. Durch diese Untersuchung wird ganz sicher erwiesen, dass die β -Oxydationstheorie von Knoop auch in der Magenwand gilt.

LITERATUR.

- Baer, K. u. Blum, L. (1906): Arch. f. Experm. Pathol. u. Parmacol. **56**, S. 85–115.
„ „ (1908): Arch. f. Experm. Pathol. u. Parmacol. **59**, S. 321.
„ „ (1910): Arch. f. Experm. Pathol. u. Parmacol. **62**, S. 129.
Embden, G. u. Marx, A. (1908): Hofmeister Beitrag. **9**, S. 318.
Embden, G., Salomon, H. u. Schmidt, Fr. (1906): Hofmeister Beitrag., **8**, S. 129.
Huppert-Messinger: Physiol. u. Pathol. chemische Analyse, S. 739.
Ikebe, K. (1933): The Journ. of biochemistry, **17**, 2.
Knoop, F. (1905): Hofmeister Beitrag., **6**, S. 150.
Loeb, A. (1902): Centr. f. Stoffwechsel u. Verdauungskrrh. III, Nr. 8.
Matsuoka, Y. (1933): The Journ. of biochemistry, **17**, 2.
Schaffer-Mariot: Physiol. u. Pathol. chemische Analyse, S. 739.
Schwarz, L. (1903): Deutsch. Arch. f. Kl. med., **76**, S. 233.
Strauss, H. u. Philipson (1903): Zeitschr. f. Kl. med., **40**, S. 396.
Takahata u. Kume: Fukuoka-Ikadaigaku-Zashi, **19**, S. 154.
Yoshida, Y.: The Journ. of biochemistry, **17**, 2.

DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsuji)

VIII. Mitteilung.

Über den Abbau des Arginins in der Magenwand.

VON

SHINOBU MURAOKA.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan)

(Eingegangen am 22. Oktober 1934)

Nach Komarow und Krimberg (1924) ist das Methylguanidin ein starker Erreger für die Sekretion der Magen- und Darmdrüsen. Nach Yoshida (1930) befördern die Magensaftsekretion nicht nur das Methylguanidin, sondern auch die anderen Guanidinderivate, wenn sie dem Kleinhirnhund subkutan injiziert werden, wobei wahrscheinlich der Guanidinkern, welcher in den Substanzen gemeinsam enthalten ist, wirksam sein dürfte. Zum chemischen Studium des Magens sind vielfach Durchblutungsversuche mit verschiedenen Substanzen vorgenommen worden, nach denen *d*-Alanin und *l*-Leucin, welche als starke Erreger für die Magensaftsekretion bekannt sind, in der Magenwandung umgesetzt werden, um Acetonkörper aus *l*-Leucin und *d*-Milchsäure aus *d*-Alanin zu bilden (Ikebe 1933, Matsuoka 1932), ganz ähnlich wie in der Leber. Unter den Guanidinderivaten interessiert uns besonders das Arginin, welches als ein lebenswichtiger Stoff sehr vielfach zu biochemischen Untersuchungen hinzugezogen wird, besonders seit Kossel und Dakin (1902) in der Leber der Tiere die Arginase fanden. Nach Komarow wirkt das Methylguanidin bei der Darmsaftsekretion peripherisch in der Darmschleimhaut. So dürfte das Arginin auch in der Magenschleimhaut wirken, wodurch die Magensaftsekretion befördert wird. Wenn das Arginin im Laufe seiner Wirkung in der Magenschleimhaut ebenso wie in der Leber umgesetzt wird, dürfte es unter der Arginasewirkung in Harnstoff und Ornithin gespalten werden, wenn auch darüber keine Untersuchung mit dem Magen bisher vorliegt. Da das

Ornithin, dessen Schicksal noch im Organismus unklar bleibt, ein starker Erreger für die Magensaftsekretion ist, erweckt das Problem des Arginins in der Magenschleimhaut umsomehr unser Interesse. Natürlich ist es nicht ausgeschlossen, dass das Arginin in der Magenschleimhaut in andersartiger Weise umgesetzt werden kann. Um das Verhalten zutage zu bringen, wurde der Magen mit Arginin durchblutet.

Im I. Kontrollversuche, in welchem das Blut im Brutschrank digeriert wurde, fand ich 1,38 mg% Arginin, 1,41 mg% Histidin und 1,67 mg% Ornithin im Blute und im II. Kontrollversuche, in welchem der Magen nur mit Blut durchströmt wurde, 3,49 mg% Arginin 3,28 mg% Histidin, und 1,22 mg% Ornithin im Blute.

Im Hauptversuche wurde der Stickstoff in der Argininfraktion des Blutes durch die Durchblutung des Magens in beträchtlicher Weise eingebüsst, wogegen der Stickstoff in den Histidin- und Ornithinfraktionen gegen den Wert im Kontrollversuche sich sehr vermehrt vorfand. Es wurde nämlich das Arginin, welches in der Menge von 1 g dem Blute zugefügt wurde, nach der Durchblutung im Durchschnitte mit 560,7 mg und das Histidin mit 33,68 mg das Ornithin mit 28,57 mg vorgefunden. Im Mageninhalt, welcher während der Durchblutung in den Magensack ausfloss, fand ich 15,36 mg Arginin, 7,49 mg Histidin und 8,51 mg Ornithin. Die Menge des Arginins, welches durch die Durchblutung des Magens dem Blute verloren ging, war zu gross, selbst wenn man die Möglichkeit eines chemischen Zusammenhanges zwischen Arginin und Histidin sowie Ornithin in Rechnung zog, wo von später die Rede sein wird. Um das Deficit des Arginins aufzuspüren untersuchte ich die Magenwand auf die Substanzen, welche während der Durchblutung in die Magenwandung sich ablagern dürften, wie bei den Durchblutungsversuchen mit anderen Substanzen. Die Resultate sind in Tabelle IV zusammen gezeigt. Im Versuche wurde mit aus mehreren Experimenten gewonnenem, zusammengetanem Material gearbeitet. Vom Arginin ging durch die Durchblutung im Blute fast $\frac{2}{3}$ des Ausgangsmaterials verloren. Arginin, Histidin und Ornithin befinden sich immer in einer gewissen Menge in der Magenwand im Kontrollversuche. Im

Hauptversuche befand sich das Arginin hauptsächlich in der Muskelschicht, während die Histidin- und Ornithinfraktionen in etwas grösseren Mengen in den beiden Schichten, besonders in der Muskelschicht vorgefunden wurden. Bei den Untersuchungen mit Organbrei ist es im allgemeinen sehr schwierig, aus der Ornithinfraktion durch Benzoylierung Ornithursäure zu bekommen. Im meinem Falle konnte ich leider, auch nicht trotz vieler Mühe, das Ornithin als Ornithursäure identifizieren. Die Ornithinfraktionen im Blute sowie in der Magenwandung im Hauptversuche wurden im Wasserbade in eine Schale zusammen gebracht, eingengt, mit alkoholischer Picrinsäurelösung versetzt. Dabei schieden 3 verschiedene Crystalle aus. Der eine schmolz bei ca. 200°C. Aus diesem Befunde der Crystalle dürfte es sich höchst wahrscheinlich um Ornithinpicrat handeln. Bezüglich des Harnstoffes des Blutes muss berücksichtigt werden, dass die Urease in der Magenwand existiert. Nach Sumida vermindert sich der Harnstoff-N, der sich in der Höhe von 4,02 mg% im Blute befand, nach der Durchblutung des Magens bis auf 1,79 mg%, wogegen der Wert des Ammoniak-N im Blute von 0,75 mg%, bis auf 2,82 mg% aufstieg. Im Hauptversuche mit Arginin fand ich 4,97 mg% Harnstoff-N nach der Durchblutung. Dass der Harnstoff-N des Blutes in diesem Versuche sehr reichlich vorgefunden wurde, dürfte so aufzufassen sein, dass das Arginin in der Magenwandung gespalten wurde, um einerseits Ornithin und andererseits Harnstoff zu bilden. Der Stickstoff in der Ammoniakfraktion wurde im Versuche auch sehr reichlich, bzw. 5,33 mg% vorgefunden. Es wird angenommen, dass der Harnstoff, welcher aus dem Arginin abgespalten wurde, durch die Ureatische Wirkung in der Magenwandung in Ammoniak übergeführt wurde. Hinsichtlich der Arginasefrage in der Magenwandung muss die Summe des Stickstoffs im Harnstoff sowie in den Ammoniakfraktionen auch in Betracht gezogen werden. Der Stickstoff in den beiden Fraktionen betrug zusammen 10,3 mg%. Nach Sumida wurde der Stickstoff in denselben Fraktionen im Durchblutungsversuche mit blossen Blute in der Menge von 4,61 mg% vorgefunden. Die Differenz des Stickstoffs in den beiden Versuchen muss das Produkt sein, welches durch

das Arginin verursacht wurde. Wenn man annehmen darf, dass das Arginin bei arginatischer Wirkung in der Magenwand gespalten wurde, müsste das Ornithin in Blute vermehrt gefunden werden. In meinem Fall beträgt es ja 28,57 mg. Auser im Blute dürfte das Ornithin sich in der Magenwandung befinden. Wie man in Tabelle IV sieht, befindet sich das Ornithin nach der Durchblutung des Magens nur mit Blut in der Menge von 10,5 mg in der Schleimhaut und 17,2 mg in der Muskelschicht, also zusammen 27,7 mg im Durchschnitte. Im Hauptversuche mit Arginin wurde 11,6 mg Ornithin in der Schleimhaut und 36,6 mg in der Muskelschicht, also zusammen 48,2 mg im Durchschnitte vorgefunden. Der Ornithingehalt des Hauptversuches ist immer grösser als der des Kontrollversuches in allen Teilen. Die Herkunft des Ornithins, welches im Hauptversuche vermehrt vorgefunden wurde, muss so erklärt werden, dass es aus dem zugesetzten Arginin in der Magenwandung abgespalten wurde. Nach diesem Resultate ist es ganz sicher, dass die Arginase in der Magenwandung existiert, wodurch das Arginin in den Schleimhaut- und Muskelschichte der Magenwand einerseits in Harnstoff und anderseits in Ornithin gespalten wird. Nicht nur Arginin und Ornithin, sondern auch eine bestimmte Menge Stickstoff wird in der Histidinfraktion im Blute, im Magensaft, sowie in der Magenwandung immer vorgefunden. Im Kontrollversuche wurden im Blute 3,28 mg% Histidin, und in der Schleimhaut und Muskelschicht je 7,9 mg% bzw. 9,2 mg% vorgefunden. Aus den Histidinfraktionen von verschiedenen Portionen im Hauptversuche wurde das Histidin als Histidinpicrolonat chemisch rein isoliert, welches bei 232°C. schmolz. An dieser Stelle erinnere ich an die Arbeit von Hopkins und Acroyd (1916). Nach ihren experimentellen Untersuchungen nehmen sie an, dass Arginin und Histidin im Stoffwechsel des tierischen Organismus innerhalb einer bestimmten Schranke nebeneinander äquivalent sind und von einem in das andere verwandelt werden. Felix und Tomita (1923) konnte es nicht gelingen, beim Durchblutungsversuche mit Leber die Bildung von Histidin aus Arginin nachzuweisen. Aber im Bebrütungsversuche mit Hühnereiern, welchen Senju (1925) unter der Leitung

von Tomita ausführte, sieht man, dass der Histidingehalt des Embryo mit der Dauer der Bebrütung zunahm, und andererseits der Arginingehalt allmählich abnahm. Mein Befund, der erstens die Annahme von Hopkins und Ackroyd sehr kräftig stützt, zeigt ferner, dass der Vorgang selbst in der Magenwandung vor sich geht.

Wenn man die Resultate dieses Versuches zusammenfassend überblickt, sieht man, dass das Arginin in der Magenwandung umgesetzt wird, um einerseits Ornithin und Harnstoff und andererseits Histidin zu bilden, das Arginin und die Verwandlungsprodukte andererseits nicht nur im Blute, sondern auch im Magensaft, welcher während der Durchblutung secerniert wurde und in der Magenwand, besonders in der Muskelschicht. Das zurückgewonnene Arginin ist viel geringer als der zugesetzte Arginin, wenn auch das Histidin und Ornithin zu Arginin umgerechnet und alle miteinander zusammengezählt wurden, so dass angenommen werden muss, dass das Arginin in der Magenwandung zum Teil in andersartiger Weise umgesetzt wird.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zur Durchblutung wurde Hundemagen gebraucht. Die Durchblutungsmethode geschah genau nach Matsuoka und Yoshida. Dem Blut wurde 1 g. Arginin zugesetzt, dessen N-Wert nach Kjeldahl ermittelt und genau mit H-Cl neutralisiert wurde. Nach der Durchblutung wurde das Blut mit Schenks-Lösung gefällt. Das Filtrat wurde nach Kossel und Kutscher behandelt, wodurch die Fraktionen von Arginin, Histidin und Lysin isoliert wurden, und die Ornithinfraktion wurde aus der Lysinfraktion nach Felix und Tomita gewonnen. Der Wert der Substanzen in jeder einzelnen Fraktion wurde durch die N-Bestimmung ermittelt. Der Mageninhalt, welcher während der Durchblutung secerniert wurde, wurde wie das Blut behandelt. Die Schleimhaut und die Muskelschicht wurden mit kochenden Wasser extrahiert. Der Extrakt wurde wie das Blut behandelt.

TABELLE I.

Im Versuche stand das Blut 3 Stunden im Brutschrank.

Versuchs Nr.	Blutmenge in ccm	Arginin mg %	Histidin mg %	Ornithin mg %
I	200	1,85	2,32	1,37
II	800	1,01	1,32	0,85
III	800	1,28	0,58	2,83
		1,38	1,41	1,67

TABELLE II.

Der Magen wurde 3 Stunden lang mit dem Blute durchströmt,
welchem kein Arginin hinzugefügt wurde.

Versuchs Nr.	Blutmenge in ccm	Arginin mg %	Histidin mg %	Ornithin mg %
I	170	4,60	3,03	2,09
II	178	2,39	3,53	0,35
		3,49	3,28	1,22

TABELLE III.

Der Magen wurde 3 Stunden lang mit dem Blute durchströmt,
welchem 1 g. Arginin hinzugefügt war.

Blut									Magen-inhalt			
Menge in ccm	U-N mg %	NH-N mg %	Arginin		Histidin		Ornithin		Menge mg %	Arginin in mg	Histidin in mg	Ornithin in mg
			in mg	mg %	in mg	mg %	in mg	mg %				
250	—	—	551	220.0	28.0	11.2	15.3	6.12	19	29.2	6.7	5.9
250	—	—	618	247.0	44.1	17.6	52.5	20.8	12	3.42	3.46	17.0
300	—	—	744.5	248.0	3.7	1.2	53.4	17.8	—	—	—	—
300	—	—	625.3	208.6	9.18	3.1	8.96	2.98	21	29.2	2.3	2.9
330	—	—	318.0	96.5	29.0	8.8	2.6	7.88	16	2.3	Spur	2.0
300	—	—	344	114.6	42.0	14.0	1.4	4.6	25	23.0	13.0	14.0
300	3.15	5.25	590	196.5	50.6	16.8	29.0	9.6	9	10.68	13.9	7.3
300	4.19	6.06	695.2	231.7	59.9	19.9	32.9	10.9	8	16.84	7.2	5.8
250	7.58	4.7	—	—	36.7	14.6	25.1	10.0	18	8.25	13.4	13.2
Im mittel	4.97	5.33	560.7	195.3	33.68	11.88	28.57	10.07	15.36	7.49	7.49	8.51

TABELLE IV.

Im Versuche wurde die Verteilung der Substanzen in der Magenwandung untersucht.

Hauptversuche.

		Menge	Arginin		Histidin		Ornithin	
			in mg	mg %	in mg	mg %	in mg	mg %
Blut	5 Versuche zusammen	1530 cc.	180.8	118.1	193.8	12.7	209.5	13.7
	für 1 mal umgerechnet	506 cc.	361.6		38.7		41.8	
Schleimhaut	zusammen	419 g	136.8	32.7	108.1	25.8	58.1	13.9
	umgerechnet	83.8 g	27.4		21.6		11.6	
Muskelschicht	zusammen	496 g	628.9	126.8	137.3	28.6	182.8	36.9
	umgerechnet	99.2 g	125.8		27.4		36.6	

Kontrollversuche.

		Menge	Arginin		Histidin		Ornithin	
			in mg	mg %	in mg	mg %	in mg	mg %
Schleimhaut	5 Versuche zusammen	294 g	78.2	26.6	23.2	7.9	52.8	17.9
	für 1 mal umgerechnet	58.8 g	15.6		4.6		10.5	
Muskelschicht	zusammen	297 g	454.0	146.2	27.4	9.2	85.8	28.9
	umgerechnet	59.4 g	86.8		5.5		17.2	

LITERATUR.

- Ackroyd, H. and Hopkins, F. G. (1916): The Biochemical Journal, **10**, 551.
- Felix, K. und Tomita, M. (1923): Hoppe-Seyler Z. f. physiol. Chem., **128**.
- Ikebe, K. (1930): This Journal, **17**, No. 2.
- Komarow, S. A. (1924): Biochemische Zeitschrift, **147**, 221.
- Kossel und Dakin (1902): Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiol. Chem., **41**, 321.
- Matsuoka, Y. (1933): This Journal, **17**, No. 2, 267.
- Senju, Y. (1925): This Journal, **5**, No. 3, 391.
- Yoshida, Y. (1930): Nagasaki Igakkai Zasshi, **8**, 477.
- Yoshida, Y. und Sumida, S. (1933): Nagasaki Igakkai Zasshi, **2**, No. 2, 270.

DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsuji)

IX. Mitteilung.

Über das Kreatinproblem des Magens I.

(Kreatininbildung aus Kreatin in der Magenwandung)

VON

YOSHIRO HONGO.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan)

(Eingegangen am 22. Oktober 1934)

In der vorhergehenden Mitteilung berichtete ich mit Ide (1932), dass Kreatin und Kreatinin im menschlichen sowie im tierischen Magensaft immer als dessen normale Bestandteile sich vorfinden, wenn auch in sehr geringer Menge. Auf experimenteller Grundlage drückten wir damals die Meinung aus, dass die Substanzen nicht direkt aus dem zirkulierenden Blute physikalisch in den Magen transportiert werden, sondern in der Magenwand aus ihrer Muttersubstanz neugebildet und mit dem Magensaft sezerniert werden dürften. Im fieberhaften Stadium der Typhuskranken, in welchem R-N, Harnstoff, Ammoniak und Aminosäure in ihrem Magensaft stets in hoher Prozentzahl sich befinden, wurde das Ges.-Kreatinin auch immer sehr hoch gefunden (Ide, 1932). Die Zunahme der Kreatininmenge war aber auf den Kreatinanteil beschränkt, wogegen die Menge des Kreatinins bis zur Hälfte des normalen Wertes des Gesunden sank.

Dass Kreatin und Kreatinin im Organismus miteinander in einem physiologisch-chemischen Zusammenhang stehen, ist auf Grund der Arbeit von Pekelharings Schule als bewiesen anzusehen (1909, 1910), und wir sind jetzt berechtigt anzunehmen, dass Kreatinin gewöhnlich einer Anhydrierung des Kreatins seine Entstehung verdankt, wobei nach der Untersuchung seiner Schule die Leber eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Cathcart 1909; Paton 1910; Pekelharing u. Hoogenhuyze 1910; Levene

u. Kristeller 1909; Lymann und Trimby 1917). Das ist die Veranlassung, aus welcher die Untersuchung des Kreatinstoffwechsels zur Funktionsprüfung der Leber einmal unternommen wurde. Bei Phosphorvergiftung und bei Degenerationsprozessen im Leberparenchym sollte das Kreatin eigentlich auf Kosten des Kreatinins im Harn sich vermehrt befinden (Lefmann, 1908). Aber bei Ausschaltung der Leber aus dem Pfortakreislauf blieb der Kreatinstoffwechsel unbeeinflusst (London u. Bolgarski 1909; Towles u. Voegetlin 1912). Ebenso wenig vermochte Ishiwara bei subchronischer Phosphorvergiftung irgend etwas von einer derartigen Beeinflussung zu bemerken (Ishiwara, 1912).

Also kann der Sitz der Anhydrierung nicht nur auf die Leber beschränkt sein, sondern der Vorgang muss auch in anderen Geweben stattfinden. Nach Entbindung der Frau wird Kreatin im Harn immer vermehrt gefunden. Die Erscheinung scheint nicht mit Involution des Uterus, sondern vielmehr mit der Tätigkeit der Milchdrüse zusammenzuhängen (Mellanby, 1913). Nach unserer Meinung sind das Kreatin und Kreatinin im Magensaft Umsatzprodukte des Gewebes in der Magenwand selbst. Wenn diese Anschauung der Wirklichkeit entspricht, so folgt ohne weiteres, dass der Anhydrierungsprozess des Kreatins zum Kreatinin in der Magenwand in normaler Weise stattfindet, weil das Kreatinin immer im Magensaft sich vorfindet, und dass demgemäss der Kreatinstoffwechsel an Ort und Stelle in der Fieberperiode gesteigert, während der Anhydrierungsprozess des Kreatins dadurch stark beeinträchtigt sein muss. Es muss vor allem bestätigt werden, ob die Magenwand wirklich die Fähigkeit besitzt, dass Kreatin zum Kreatinin zu anhydrieren. Zu diesem Zweck wurden Durchblutungsversuche des Hundemagens mit Kreatin vorgenommen. Bei Durchblutung des Hundemagens ohne Kreatinbelastung beobachtete ich, dass der Wert des Kreatinins im Nachblute immer etwas höher war als im Vorblute und der Wert des Kreatins im Nachblute immer etwas niedriger als im Vorblute. Es wurde nämlich nach Durchblutung im Durchschnitt im Blute 0,05 mg% Kreatinin mehr und 0,02 mg% Kreatin weniger als im Vorblute vorgefunden. Im Magensaft, welcher während der

Durchblutung sezerniert wurde, wurden 1,39 mg% Kreatin und 1,80 mg% Kreatinin vorgefunden. Die Werte sind ca. 10fach so hoch wie die im physiologischen normalen Hundemagensafte, worauf später zurückgekommen werden wird. Kreatin und Kreatinin wurden auch, wie folgt, in der Magenwandung gefunden: 3,09 mg% Kreatinin in der Schleimhaut und 3,72 mg% in der Muskelschicht und 1,90 mg% Kreatin in der Schleimhaut und 2,91 mg% in der Muskelschicht (Tabelle I). Im Leerversuche, in welchem nur der Apparat ohne Magen mit Blut durchgeströmt wurde, wurden nach Durchblutung das Kreatin im Blute in der Menge von 0,04 mg% und das Kreatinin in der Menge von 0,08 mg% mehr als im Vorblute vorgefunden. In einem Versuche, in welchem eine bestimmte Menge des Kreatins dem Blute zugesetzt wurde, verlief der Vorgang auch ganz ähnlich wie im vorhergehenden (Tabelle II). Auf jeden Fall ist die Verschiebung der Werte beider Substanzen im Blute nach der Durchblutung in den beiden Kontrollversuchen ganz gering. Bei den Hauptversuchen wurde die wässrige Lösung des Kreatins in einer bestimmten Menge dem Blute zugesetzt und durch geströmt. Durch die Durchblutung trat eine starke Veränderung in der Verteilung des Kreatins und Kreatinins im Blute zum Vorschein. Es verminderte sich nämlich der Werte des Kreatins durch die Durchblutung von 38,53 mg% bis 15,65 mg%, wogegen der Wert des Kreatinins dadurch von 1,73 mg% bis auf 2,38 mg% im Durchschnitte aufstieg, ja in einigen Versuchen in der Menge von 4,63–5,40 mg% im Nachblute vorgefunden wurde (Tabelle III). Im Magensafte, welcher während der Durchblutung sezerniert wurde, wurde 1,4 mg% Kreatinin und 6,16 mg% Kreatin vorgefunden. Eigentlich befinden sich die beiden Substanzen im reinen Magensafte des Kleinmagenhundes in ganz geringer Menge; in bei Fleischfütterung sezerniertem Magensafte wurden 0,20 mg% Kreatin und 0,27 mg% Kreatinin vorgefunden. Aber bei den Kontrolldurchblutungsversuchen wurden die beiden Substanzen in beträchtliches Höhe vorgefunden, wie man in Tabelle I sieht. Die Durchblutung wurde unter 25 mm Hg-Säulendruck ausgeführt. Trotzdem wurde der Mageninhalt unerwartet mit Blut etwas verunreinigt, was teilweise

daran schuld sein könnte, dass Kreatin und Kreatinin im Magensaft im hohem Werte vorgefunden wurden. Wenn dies der Fall wäre, so ist es schwer verständlich, dass die beiden Substanzen im Kontrollversuche, besonders Kreatin, im Magensaft reichlicher als im Blute vorgefunden wurden. Diese Erscheinung muss so erklärt werden, dass die beiden Substanzen durch die dabei gesteigerte Tätigkeit der Magenwandung gebildet und mit dem Magensekret mitsezerniert wurden. Im Hauptversuche erhielt ich im Magensaft 6,16 mg% Kreatin, worunter ein Teil der Substanz seinen Ursprung dem Blutkreatin verdanken mag, weil das Blut mit Kreatin übersättigt war. In der Schleimhaut- und Muskelschicht wurde Kreatin im Hauptversuche deutlich mehr als im Kontrollversuche vorgefunden. Das Kreatin mag auch dem Blutkreatin zuzuschreiben sein. Aber bezüglich des Kreatinins vermehrt es sich nach der Durchblutung deutlich im Blute. Nämlich war die Vermehrung des Kreatininwertes in sämtlichen Portionen, die ich untersuchte, besonders im Blute sowie in der Muskelschicht ausgezeichnet hochgradig. Aus dem Resultate des Versuchs ist ganz klar ersichtlich, dass das Kreatinin in der Magenwandung unter Verbrauch von Kreatin gebildet wurde. Aber das Kreatin, welches während der Durchblutung des Magens aus dem Blute verloren ging, war gegen den Kreatininanteil, welcher in sämtlichen Portionen vermehrt vorgefunden wurde, zu gross. Beim Durchblutungsversuche des Magens mit verschiedenen Substanzen werden diese Substanzen im allgemeinen nicht nur im Blute, sondern im Magensaft, in der Schleimhaut- sowie Muskelschicht in einer bestimmten Menge vorgefunden. In diesem Versuche wurde 4,36 mg% Kreatin im Magensaft, 2,63 mg% in der Schleimhautschicht und 1,55 mg% in der Muskelschicht, also zusammen 8,54 mg mehr als im Kontrollversuche vorgefunden. Aber seine absolute Menge sollte noch kleiner sein, weil, während die Schleimhaut- und Muskelschicht im frischen Zustande ungefähr 100 g wog, die Menge des Magensaftes in einzelnen Versuchen nur 20–30 cc. betrug. Also kann das Defizit des aus dem Blute verloren gegangenen Kreatins, dessen absolute Menge 68, 64 mg betrug, indem die Resultate im Kontrollversuche in Rechnung gezogen werden, natürlich

nicht erfüllt werden. Nach Gottlieb und Stangassiger wird das Kreatin in den Geweben nicht nur zu Kreatinin umgewandelt, sondern manchmal auch die beiden Substanzen unter fermentativer Einwirkung zerstört (Gottlieb u. Stangassiger, 1907, 1908). Nach Pekelharing und seinen Mitarbeitern wird das Kreatin, welches parenteral in den Kreislauf von Säugetieren gelangt, im Organismus, und zwar wahrscheinlich in der Leber, der Zersetzung ausgesetzt. In meinen Versuchen wurde nach der Durchblutung im Durchschnitte ungefähr 10 fach soviel Ammoniak-N wie im Vorblute vorgefunden. Gewöhnlich verschiebt sich der N in der Harnstofffraktion im Blute durch Durchblutung nach der Ammoniakfraktion. Wenn man jedoch zur Beurteilung des Verhaltens auch die Resultate meiner Versuche heranzieht, so betrug das überschüssige Ammoniak-N nur 0,31 mg%, also in der absoluten Menge 0,93 mg, wogegen der N, welcher im verlorenen Kreatin enthalten ist, über 8,0 mg gefunden werden sollte.

SCHLUSS.

Wenn das Kreatin durch den isolierten Magen durchgeströmt wird, so wird es in der Magenwand umgesetzt, um einerseits, hauptsächlich in der Muskelschicht, Kreatinin zu bilden, anderseits unter unbekannten Chemismus unterzugehen.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Experimente wurde Hundemagen gebraucht. Die Durchblutung geschah wie gewöhnlich. Blut, Magensaft, welcher während der Durchblutung sezerniert wurde, und Muskel- und Schleimhautschicht wurden auf Kreatin und Kreatinin untersucht. Blut wurde mit Schenks Lösung gefällt, filtriert. In das Filtrat wurde H S eingeleitet, um das überschüssige Hg zu beseitigen, und filtriert. Nach Entfernung des überschüssigen Schwefelwasserstoffes mittels Durchleitens von Luft wurde das Filtrat unter vermindertem Druck bis zu einer bestimmte Menge eingengt, und mit einem aliquoten Teil der Flüssigkeit nach Pincussen auf Kreatin und Kreatinin untersucht. Magensaft wurde wie Blut behandelt. Muskel- und Schleimhautschicht wurden in Reibeschale

breiig zermahlen und im Wasser 24 Stunden extrahiert. Das Extrakt wurde wie Blut behandelt.

TABELLE I.
Der Magen wurde bloss mit Blut ohne Kreatin durchströmt.

Versuchsnummer		Vor Durchblutung mg %	Nach Durchblutung			
			Blut mg %	Magensaft mg %	Schleimhaut mg %	Muskel mg %
I	Kreatinin	1,25	1,30		3,00	3,12
	Kreatin	0,97	0,93		1,07	2,34
II	Kreatinin	1,18	1,20		2,94	3,17
	Kreatin	0,98	0,94		3,06	1,89
III	Kreatinin	1,54	1,62	1,57	3,33	3,78
	Kreatin	1,07	1,04	2,18	1,58	2,22
IV	Kreatinin	1,33	1,40	1,21		4,80
	Kreatin	1,15	1,10	1,42		5,20
im Durchsch.	Kreatinin	1,33	1,38	1,39	3,09	3,72
	Kreatin	1,04	1,02	1,80	1,90	2,91

Nach der Durchblutung stieg durchschnittlich der Wert des Kreatinins um 0,05 mg auf und der des Kreatins um 0,02 mg für 100 Teile Flüssigkeit ab. Ausserdem wurde 1,39 mg% Kreatinin im Magensaft, 3,09 mg% in der Schleimhaut und 3,72 mg% in der Muskelschicht, 1,80 mg% Kreatin im Magensaft, 1,90 mg% in der Schleimhaut und 2,91 mg% in der Muskelschicht vorgefunden.

TABELLE II.
Bei den Kontrollversuchen wurde es nur durch den Durchblutungsapparat ohne Magen durchgeströmt.

Versuchsnummer		Blutmenge u. belastete Kreatinmenge	Vor der Zirkulation mg %	Sofort nach Belastung mg %	Nach der Zirkulation mg %
I	Kreatinin	Blut 300 cc.	2,05	2,11	2,12
	Kreatin	Kreatin 0.15 g	0,45	34,56	33,79
II	Kreatinin	Blut 300 cc.	1,54		1,62
	Kreatin	keine Belastung	1,40		1,44
III	Kreatinin	Blut 300 cc.	1,22		1,30
	Kreatin	keine Belastung	1,41		1,46

Nach der Durchblutung wurden die beiden Substanzen in geringer Menge vermehrt vorgefunden. Kreatinin stieg um 0,08 mg und Kreatin um 0,04–0,05 mg für 100 Teile Flüssigkeit auf.

Nach der Durchblutung stieg der Wert des Kreatinins durchschnittlich im Blute von 1,73 mg% bis 2,83 mg% auf; es wurde in der Schleimhaut 3,64 mg%, in der Muskelschicht auf 5,47 mg% und im Magensaft auf 1,41 mg% vorgefunden. Diese Kreatininwerte in sämtlichen Portionen, die ich untersuchte, überstiegen ausnahmslos deutlich die im Kontrollversuche, ganz besonders im Blute sowie in der Muskelschicht; und zwar in manchen Versuchen im Blute um 5,40 mg% gegen 1,20–1,62 mg% im Blute im Kontrollversuche und in der Muskelschicht um 10,07 mg% gegen von 3,12–4,80 mg% im Kontrollversuche. In Bezug auf das Kreatin im Blute stieg seine Menge durch die Durchblutung auffallend niedrig ab; im Durchschnitte von 37,46 mg% bis auf 15,64 mg%, ja manchmal bis auf ein viertel seiner Menge im Vorblute. Doch wurde das Kreatin in der Magenwandung gegen den Kontrollversuch mitunter im Magensaft sehr hoch vorgefunden; nämlich 6,16 mg% im Magensaft, 4,53 mg% in der Schleimhaut und 4,46 mg% in der Muskelschicht. Es ist leicht verständlich, dass die Vermehrung des Kreatins in sämtlichen Portionen auf Ablagerung des Blutkreatins beruht. Jedoch entspricht die vermehrte Menge des Kreatinins sowie des Kreatins, die nach der Durchblutung im Blute sowie in der Magenwandung vorgefunden wurde nicht der Menge des Kreatins, welches im Blute verloren ging, wie ich früher numerisch ausführlich zeigte. Im Blute stieg der Wert des Ammoniak-N von 0,55 mg% nach der Durchblutung bis 4,33 mg% auf, und der Harnstoff-N dadurch von 8,34 mg% bis 4,87 mg% ab. Also scheint es, dass der grösste Teil des N in der Harnstofffraktion in die Ammoniakfraktion übergang, worüber von Sumida schon ausführlich berichtet wurde. Wenn es auch vorläufig angenommen wird, dass der kleinere Teil des überschüssigen Ammoniak-N aus dem Untergang des Kreatins herrührt, bleibt die Frage des Schicksals einer grossen Menge des Kreatins, welches aus meinem Untersuchungskreis verloren ging, noch unklar.

TABELLE III.
Hauptversuche.

Versuchs- nummer	Vor- Durch- blutung mg %	Nach Belastung					Vor und nach Durchblutung		
		belast. Kreatin- menge mg %	sofort nach Belastung mg %	Blut mg %	Magen- saft mg %	Schleim- haut mg %	Muskel mg %	Ammoniak- N mg %	Harn- stoff-N mg %
I	Kreatinin Kreatin	30	2,00 33,00	2,22 14,28					
II	Kreatinin Kreatin	30	2,25 32,65	2,55 8,88					
III	Kreatinin Kreatin	30	1,56 29,94	1,82 11,51					
IV	Kreatinin Kreatin	30	2,88 29,62	5,40 7,60	1,11 2,49	2,97 4,23	7,45 6,42	0,60 2,83	4,32 2,60
V	Kreatinin Kreatin	30	1,42 32,27	1,75 13,63	1,28 8,28	3,30 2,90	2,82 4,10	0,67 5,63	12,10 3,87
VI	Kreatinin Kreatin	50	1,56 51,33	1,75 17,20	1,50 12,50	3,35 3,37	2,29 1,60	0,36 7,17	7,93 5,44
VII	Kreatinin Kreatin	80	1,25 75,67	4,63 27,33	1,00 5,50	5,25 4,75	10,07 2,73		
VIII	Kreatinin Kreatin	30	1,17 27,40	2,43 17,57	2,16 2,15	3,81 5,08	4,80 5,20	0,56 2,52	5,32 3,92
IX	Kreatinin Kreatin	30	1,39 25,28	2,44 22,87		3,17 6,83	5,45 6,82	0,56 4,48	12,04 8,54
im Dureschn.	Kreatinin Kreatin		1,73 37,46	2,83 15,64	1,41 6,16	3,64 4,53	5,47 4,46	0,55 4,33	8,34 4,87

LITERATUR.

- Cathcart, E. P. (1909): Journ. of physiol., **39**, 320.
- Gottlieb, R. u. Stangassinger, R. (1907/1908): Zeitschr. f. physiol. Chem., **52**, 1 und **55**, 295 und 322.
- Hoogenhuyze, C. J. C. u. Verploegh, H. (1908): Zeitschr. f. physiol. Chem., **58**, 161.
- Ide, H. u. Hongo, Y.: Nagasaki Igakkwai Zassi, Jahrgang 10, Nr. 5.
- Ide, H.: Nagasaki Igakkwai Zassi, Jahrgang 10, Nr. 6.
- Ishiwara, H. (1912): Biochem. Zeitschr., **41**, 315.
- Lefmann, G. (1908): Zeitschr. f. physiol. Chem., **57**, 468.
- Levene, P. A. u. Kristeller, L. (1909): Amer. Journ. of physiol., **24**, 44.
- London, E. S. u. Bolgarski, N. (1909): Zeitschr. f. physiol. Chem., **62**, 465.
- Lyman and Trimby (1917): Journ. of biol. chem., **29**.
- Mellanby (1913): Proc. Roy. soc. B., **86**.
- Paton, D. N. (1910): Journ. of physiol., **69**, 395.
- Pekelharing, C. (1909): Zentralblatt f. Stoffwechselkrh., No. 8.
- Pekelharing, C. A. u. Hoogenhuyze, C. (1910): Zeitschr. f. physiol. Chem., **69**, 395.
- Towles, C. u. Voegtlin, C. (1912): Journ. of biol. Chem., **10**, 479.

DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji.)

X. Mitteilung. Über das Kreatinproblem des Magens. II.

(Kreatinbildung aus Arginin in der Magenwandung.)

VON

YOSHIRO HONGO.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan)

(Eingegangen am 22. Oktober 1934)

Aus der theoretischen Erwägung, dass das Arginin in vitro mittels Bariumpermanganats zu Guanidinbuttersäure übergeführt wird, ist schon lange angenommen, dass Kreatin über diese oder ihre weiteren Stufen wie Guanidinessigsäure unter Methylierung im Organismus entstehen dürfte. Während Pommerenig nach Darreichung von Guanidincarbonat an Tiere und Vögel keine Vermehrung ihres Harnkreatins beobachten konnte (1902), ist es seit Jaffe (1906) durch viele Beobachtungen (Donner 1907; Palladin 1905; Thompson 1917) nachgewiesen, dass das Kreatin sich im Harne sowie im Muskel der experimentellen Tiere und Vögel sehr vermehrt vorfindet, wenn sie mit Guanidin oder mit dessen Derivaten oral oder subcutan behandelt worden sind. Untersuchungen darüber, ob das Kreatin direkt aus Arginin her stammt, wurden von Jaffe (1906) und Verploegh (1905), Meyer und Fine (1915), Baumann und Marker (1915) und Lieben und Laszlo (1925) mit negativem Erfolge gemacht. Doch beobachtete Inoue beim Durchblutungsversuche der Leber mit Arginin eine Vermehrung des Kreatins im Blute (1912) und Hines (1912) und Gross und Steenbock (1921) bei subcutaner oder oraler Darreichung des Arginins an Tiere eine Steigerung des Harnkreatins. Ganz kürzlich beobachtete Isota, dass Kreatin und Kreatinin bei Durchblutungsversuche der Leber mit Arginin im Blute sowie in der Galle an Menge deutlich zunahm (1934). Hinsichtlich der Herkunft des Kreatins müssen die Untersuchungen

von Thompson zuerst unter anderen erwähnt werden. Bei Darreichung des Arginins an Tiere und Vögel beobachtete er eine Vermehrung des Harnkreatins, besonders wenn sie mit Methylcitrat subcutan injiziert wurden. Ausserdem injizierte er den experimentellen Tieren bald Arginin mit Cholin, bald Arginin mit Betain, wobei Harnkreatin im ersten Falle grösser als im letzteren vorgefunden wurde. Dass der Kreatinwert des Muskels von Ratten nach subcutaner Injektion mit Cholin deutlich aufsteigt und das Harnkreatin des Kaninchens durch subcutane Darreichung von Cholin und Betain sich sehr vermehrt, wurde schon von Riesser beobachtet (1913 und 1914). Aus seinen Ergebnissen schloss er, dass das Cholin durch die chemische Umsetzung mit Harnstoffen im Organismus das Kreatin liefert. Abderhalden und seine Mitarbeiter bestätigten durch Autolysenversuche von Organbrei mit Arginin und Cholin die Annahme von Riesser, indem das Arginin vermutlich dazu dienen sollte, durch die Arginase des Organbreies den Harnstoff zu liefern (1927, 1928). Also dürfte es zwei Wege zur Entstehung des Kreatins aus Arginin geben. Das Arginin dient nämlich, nach der einen Annahme, nur als Quelle des Harnstoffes unter Voraussetzung der chemischen Umsetzung des Cholins und des Betains, aber nach der anderen Annahme als ein Träger des Guanidinkerns, welcher zur Bildung des Kreatins im Organismus eine Methylierung verlangt. Auf dem Wege der chemischen Untersuchung des Magens mit Arginin, welches ein starker Erreger für Magensaftsekretion ist, beobachtete Muraoka, dass das Arginin in der Magenwand in hohem Masse angegriffen wurde, indem der N in den Histidin- sowie den Ornithinfraktion sehr vermehrt vorgefunden wurde. Aus der Ornithinfraktion konnte er Ornithinpicrat isolieren, welches durch die Schmelzpunktbestimmung identifiziert wurde. Wenn das Ornithin durch die Arginase in der Magenwandung aus dem Arginin gespalten wurde, müsste anderseits gleichzeitig Harnstoff gebildet werden, wogegen in Wirklichkeit der Harnstoff dabei in der Menge nicht nur keine Andeutung von Vermehrung zeigte, sondern im Gegenteil vermindert nachgewiesen wurde, ganz ähnlich wie die Ergebnisse in den anderen Durchblutungsversuchen mit anderen Substanzen,

wo der Harnstoff im Blute durch ureatische sowie andersartige Wirkungen in der Magenwandung zum grössten Teil verloren ging, worüber Sumida schon ausführlich berichtete.

Weil das Cholin anderseits ein normaler Bestandteil der Magenschleimhaut ist, könnte es möglich sein, auf diesem Wege das Kreatin zu bilden. Wenn die Arginase in der Magenwand fehlt, weil in den Versuchen keine Vermehrung des Harnstoffes nachgewiesen wurde, entsteht aus der konstruktuellen Formel des Arginins die Frage, ob der Guanidinkern, welcher vom Ornithinanteil abgespalten wurde, sich nicht nur zu Histidin, worauf Muraoka schon hinwies, sondern auch zu Kreatin umgewandeln mag.

Um auf jeden Fall zuerst zu erfahren, ob das Arginin in der Magenwandung zu Kreatin umgewandelt werden kann, unternahm ich Durchblutungsversuche des Hundemagens mit Arginin. Zum Versuche wurde Hundemagen gebraucht. Im Hauptversuche wurde 1,0–0,5 g Arginin dem Blute zugesetzt. Die Durchströmung dauerte 3 Stunden. Die Bestimmungsmethoden von Kreatin, Kreatinin, Harnstoff und Ammoniak waren ganz gleich denen der vorigen Mitteilung. Wie unten berichtet, nimmt das Kreatin im Blute nach der Durchblutung des Magens gewöhnlich in ganz geringer Menge ab, wogegen im Hauptversuche mit Arginin der Kreatinwert im Blute nach Durchblutung ausnahmslos deutlich aufstieg, und zwar im Durchschnitte von 0,79 mg% bis 1,33 mg%. Die Zunahme betrug also 68% des präformierten Kreatins. Die Verschiebung des Kreatininwertes fand dadurch ganz ähnlich wie im Kontrollversuche in der vorigen Mitteilung statt.

Im Magensaft, welcher während der Durchblutung in den Magen ausschied, wurde 1,53 mg% Kreatin und 1,27 mg% Kreatinin, in der Schleimhaut 3,41 mg% Kreatin und 1,64 mg% Kreatinin und in der Muskelschicht 1,44 mg% Kreatin und 1,30 mg% Kreatinin vorgefunden. Im Versuche wurde der N, welcher in der Harnstofffraktion verloren ging, durchschnittlich zum grossen Teil in der Ammoniakfraktion vorgefunden. Es ist aber noch unklar, ob der N in der letzteren Fraktion restlos aus dem Harnstoff umgewandelt wurde, weil die ureatische Wirkung der Magenschleimhaut nach Sumida nicht kräftig ist.

Versuchs- nummer	Vor Durch- blutung mg %	Nach Belastung						Vor und nach Durchblutung		
		belast. Arginin- menge mg	sofort nach Belastung mg %	Nach Durchblutung					Ammoniak- N mg %	Harn- stoff-N mg %
				Blut mg %	Magen- saft mg %	Schleim- haut mg %	Muskel mg %			
I	Kreatinin Kreatin	1000	1,10 0,72	1,24 1,46	0,92 0,51	2,68 2,46	1,50 1,58	Vor nach	0,56 5,32	10,92 5,46
II	Kreatinin Kreatin	500	1,14 0,86	1,26 1,25	1,28 0,81	2,03 5,19	1,23 1,56	Vor nach	0,42 9,52	11,76 10,96
III	Kreatinin Kreatin	500	1,13 0,84	1,38 1,55	0,94 1,59	1,60 4,00	1,30 1,44	Vor nach	0,56 7,00	8,32 4,68
IV	Kreatinin Kreatin	500	1,20 0,47	1,17 1,13	1,83 1,95	1,52 2,32	1,25 1,04	Vor nach	0,56 4,20	9,43 6,30
V	Kreatinin Kreatin	500	1,40 1,03	1,67 1,44	2,07 1,90	1,33 4,50	1,44 1,79	Vor nach	0,56 4,76	16,24 7,42
VI	Kreatinin Kreatin	500	1,41 0,73	1,42 1,21	3,43 2,52	1,05 3,05	1,14 1,19	Vor nach	0,56 4,20	16,80 12,04
VII	Kreatinin Kreatin	500	1,99 0,91	1,35 1,39	1,57 1,49	1,26 2,38	1,27 1,46	Vor nach	0,56 4,76	11,57 4,54
im Durchschn.	Kreatinin Kreatin		1,34 0,79	1,36 1,33	1,72 1,53	1,64 3,41	1,30 1,44	Vor nach	0,54 5,69	12,15 7,34

Abgesehen von der Möglichkeit, dass das Cholin als Quelle des Kreatins im Organismus dient, ist es aus dem Ergebnisse ganz sicher nachgewiesen, dass Arginin in der Magenschleimhaut in Kreatin umgewandelt wird.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Buadze, S. (1927): *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **164**, 280.
- Abderhalden, E. u. Buadze, S. (1929): *Med. Klinik*, **25**, 11.
- Abderhalden, E. u. Möller, P. (1927): *Ebenda*, **170**, 212.
- Baumann, L. u. Hines, H. M. (1918): *Journ. of biol. chem.*, **35**, 75.
- Donner, G. (1907): *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **52**, 225.
- Riesser, O. (1913/14): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **86**, 415.
- Gross, E. G. u. Steenbock, H. (1921): *Journ. of biol. chem.*, **47**, 33.
- Hoogenhuyze, C. v. u. Verploegh (1905): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **46**, 415.
- Hongo, Y.: Diese Zeitschrift.
- Inoue, K. (1912): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **71**, 81.
- Isota, I. (1934): *The Journ. of Gastroenterol.*, **9**, 276 u. 465.
- Jaffe, M. (1906): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **48**, 430.
- Lieben, F. u. Laszlo, D. (1926): *Biochem. Zeitschr.*, **176**, 403.
- Meyer, V. C. u. Fine, M. S. (1915): *Journ. of biol. chem.*, **21**, 389.
- Palladin, A. et Wallenburger, L. (1915): *C. R. d. la Soc. d. biol.* **78**, 111.
- Pommerenig, E. (1902): *Beiträge z. chem. Physiol. u. Path.*, **1**, 561.
- Sumida, S.: Diese Zeitschrift.
- Thompson, W. H. (1917): *Biochem. Journ.*, **11**, 307; (1917): *Journ. of physiol.*, **51**, 111 u. 347; (1921): *Journ. of biol. chem.*, **47**, 33.

DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji.)

XI. Mitteilung.

Über das Kreatinproblem in der Magenwand III.

(Kreatinbildung aus Cholin in der Magenwandung.)

VON

YOSHIRO HONGO.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Fakultät in Nagasaki, Japan)

(Eingegangen am 22. Oktober 1934)

Nach Riesser steigt der Kreatingehalt im Muskel und im Harn der Tiere auf, wenn ihnen Cholinchlorid dargereicht wurde, deshalb nimmt er an, dass das Cholin durch Verkupferung mit Harnstoff im Organismus das Kreatin liefert. Die Annahme wurde von Abderhalden und seinen Mitarbeiter durch Autolysenversuche mit verschiedenen Organen besonders mit der Leber bestätigt, indem Arginin und Cholin in gewissen Mengen Organbreien zugefügt wurden, wobei das Arginin unter Wirkung der Arginase in den Organbreien den Harnstoff liefern sollte (1926, 1927). In den vorgehenden Mitteilungen berichtete ich, dass Kreatinbildung aus dem Arginin in der Magenwand vor sich geht. Nach unseren Untersuchungen finden verschiedene chemische Umsetzungen in der Magenwand ähnlich wie in der Leber statt. (Muraoka 1932; Ikebe 1933; Tsuru 1934; Wakasugi 1934, u.s.w.) Beim Studium der Kreatinfrage in der Magenwand muss es auch interessant sein, zu erfahren, ob in derselben das Cholin in Kreatin umgewandelt wird.

Im Versuche wurde 0,5 g Cholinchlorid mit Harnstoff dem Blut zugesetzt und wie gewöhnlich durch die Magenwand des Hundes geströmt. Ich erfuhr im Versuche, dass der Kreatingehalt des Blutes nach der Durchblutung deutlich aufstieg, und zwar von 0,83 mg% bis 1,24 mg%, während der Kreatiningehalt des Blutes dadurch fast unverändert blieb. Im Kontrollversuche, in welchem

bald nur mit Cholinchlorid, bald nur mit Harnstoff, bald nur mit Betain durchgeströmt wurde, wurde keine Vermehrung des Kreatins im Blute nach der Durchblutung beobachtet. Nach Riesser vermehrt sich die Kreatinausscheidung im Harne des Kaninchens, wenn ihm Betain subcutan injiziert wird, wogegen die Erscheinung von Thompson kaum nachgewiesen wurde. Im Durchblutungsversuche der Leber gelang es Isota nicht, die Kreatinbildung aus Betain nachzuweisen. Im Durchblutungsversuche des Magens mit Betain konnte ich keine Vermehrung des Kreatins im Blute nachweisen. Der Kreatinwert im Blute blieb nämlich nach der Durchblutung unverändert in dem Versuche, in welchem 0,5 g. Betain mit Harnstoff durch den Magen einen bestimmten Zeitraum durchgeströmt wurde.

EXPERIMENTELLER THEIL.

Der Hundemagen wurde durchgeströmt, wie gewöhnlich.

I

Kontrollversuche.

Im Versuche wurde der Magen bald nur mit Cholinchlorid, bald nur mit Harnstoff, bald nur mit Betain durchströmt.

TABELLE I.

Versuchsnummer		Belastete Substanzen	Durchblutung mg%	
			Vor	Nach
VIII	Kreatinin	Cholinchlorid 0.5	1.20	1.18
	Kreatin		0.97	0.93
XI	Kreatinin	"	1.25	1.26
	Kreatin		1.29	1.24
X	Kreatinin	"	1.24	1.25
	Kreatin		1.01	0.99
im Durchschnitte	Kreatinin	"	1.23	1.23
	Kreatin		1.09	1.05

Der Magen wurde nur mit Cholinchlorid durchströmt.

TABELLE II.

Versuchsnummer		Belastete Substanzen	Durchblutung mg%	
			Vor	Nach
V	Kreatinin	Harnstoff 0.5 g.	1.13	1.12
	Kreatin		0.94	1.01
VI	Kreatinin	"	1.44	1.46
	Kreatin		1.17	1.21
VII	Kreatinin	"	1.19	1.22
	Kreatin		1.07	1.10
im Durchschnitte	Kreatinin	"	1.28	1.27
	Kreatin		1.06	1.11

In diesem Versuche wurde der Magen nur mit Harnstoff durchströmt.

TABELLE III.

Versuchsnummer		Belastete Substanzen	Durchblutung mg%	
			Vor	Nach
XV	Kreatinin	Betain 0.5 g.	1.24	1.25
	Kreatin		0.85	0.87
XVI	Kreatinin	"	1.20	1.22
	Kreatin		0.72	0.79
XVII	Kreatinin	"	1.28	1.29
	Kreatin		0.87	0.86
im Durchschnitte	Kreatinin	"	1.24	1.25
	Kreatin		0.82	0.84

In diesem Versuche wurde der Magen nur mit Betain durchströmt.

II

Hauptversuche.

TABELLE IV.

Versuchsnummer		Belastete Substanzen	Durchblutung mg%	
			Vor	Nach
I	Kreatinin	Cholin chlorid 0.5 g. Harnstoff 0.5 g.	1.25	1.27
	Kreatin		0.89	1.48
II	Kreatinin	"	1.07	1.12
	Kreatin		1.24	1.42
III	Kreatinin	"	1.50	1.56
	Kreatin		0.64	1.27
VI	Kreatinin	"	1.59	1.66
	Kreatin		0.55	0.78
im Durchschnitt	Kreatinin	"	1.35	1.38
	Kreatin		0.83	1.24

In diesem Versuche wurde der Magen mit Cholinchlorid und Harnstoff durchströmt. Der Kreatinwert des Blutes nach der Durchblutung steigt von 0,83 mg% bis 1,24 mg% im Durchschnitt auf.

TABELLE V.

Versuchsnummer		Belastete Substanzen	Durchblutung mg%	
			Vor	Nach
XI	Kreatinin	Betain 0.5 g. Harnstoff 0.5 g.	1.33	1.36
	Kreatin		1.33	1.37
XII	Kreatin	"	1.33	1.23
	Kreatinin		1.35	1.39
XIII	Kreatinin	"	1.33	1.34
	Kreatin		1.23	1.23
XIV	Kreatinin	"	1.29	1.28
	Kreatin		1.09	1.08
im Durchschnitt	Kreatinin	"	1.32	1.30
	Kreatin		1.25	1.27

Im Versuche wurde der Magen mit Betain und Harnstoff durchströmt. In diesem Versuche wurde kein Vermehrung des Kreatinwertes nachgewiesen.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Buadze, S. (1927): Ebenda, **164**, 280.
Abderhalden, E. u. Buadze, S. (1929): Med. Klinik, **11**, 25.
Abderhalden, E. u. Möller, P. (1927): Ebenda, **170**, 212.
Ikebe, K.: Diese Zeitschr.
Isota, G. (1934): The Journ. of Gastroenterologie, **9**, 465.
Mutsuoka, Y.: Diese Zeitschr.
Riesser, O. (1913/14): Zeitschr. f. physiol. Chem., **86**, 415; **90**, 221.
Thompson, W. H. (1917): Journ. of physiol., **51**, 347.
Tsuru, N. Diese Zeitschr.
Wakasugi, K.: Diese Zeitschr.

DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji.)

XII. Mitteilung. Über die Urease in der Magenwand. II.

VON

SEIICHI SUMIDA.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan)

(Eingegangen am 22. Oktober 1934)

Wenn der Harnstoff intravenös injiziert wird, steigt der Ammoniakgehalt des Magensaftes auf, woraus Simici(1929, 1931) schliesst, dass der Magen befähigt ist, den Harnstoff in Ammoniak zu verwandeln. Nach Untersuchungen bei uns wird das Ammoniak im Magensaft im allgemeinen im gesteigerten Zustande der Sekretion in vermehrter Menge vorgefunden. Eigentlich ist der Harnstoff ein mässig starker Erreger der Magensaftsekretion (Yoshida und Sumida, 1933). Die Annahme von Simici darf also nicht unbesonnen anerkannt werden. Aber beim Durchblutungsversuche des Magens mit Harnstoff beobachtete ich (1934), dass der Harnstoff in einer grossen Menge im Blute eingebüsst wurde, indem der N in der Ammoniakfraktion im Blute sowie im Magensaft und in der Magenwand in einer ganz kleinen Menge vermehrt sich vorfand, woraus ich annahm, dass die ureatische Wirkung in der Magenwand jedenfalls nicht kräftig ist, wenn auch diese Wirkung dort existiert, worüber Luck (1924) schon einiges mitgeteilte. Um das Problem der Urease in der Magenwand noch genauer aufzuklären, nahm ich Durchblutungsversuche mit Lockescher Lösung vor, weil noch andere Substanzen, welche durch chemische Vorgänge in der Magenwand Ammoniak erzeugen dürften, im Blute enthalten sind, wodurch die Resultate verwirrt werden können. Natürlich wurde der Harnstoff im Hauptversuche in einer bestimmten Menge in die Lockesche Lösung eingeführt.

Im Kontrollversuche fand ich 0,28 mg% Harnstoff-N und den 0,35 mg% Ammoniak-N in der durchgeströmten Lösung. Die Substanzen wurden im Magensaft, welcher während der Durchblutung

sezerniert wurde, in der Muskel- und Schleimhautschicht immer in einer bestimmten Menge gefunden, und in einer ganz kleinen Menge in der physiologischen Kochsalzlösung im Gefässe, in welches der Magen eingetaucht worden war. Die beiden Substanzen müssen natürlich als Umsetzungsprodukte der Gewebssubstanzen in der Magenwand betrachtet werden. Das Ammoniak-N wurde in der absoluten Menge von 7,77 mg im Ganzen vorgefunden.

Im Hauptversuche wurde 1,93 mg% N in der Ammoniakfraktion in der durchgeströmten Lösung, also 5 mal so viel wie im Kontrollversuche vorgefunden, während dadurch der Harnstoff-N von 34,80 mg% bis auf 22,58 mg% abstieg. Die beiden Substanzen wurden im Magensaft, in der Magenwand sowie im Medium im Gefässe fast immer sehr hoch konzentriert vorgefunden. Der Ammoniak-N betrug nämlich in der absoluten Menge im Ganzen 20,06 mg. Also wurde das Ammoniak im Hauptversuche in der Summe ungefähr 3 fach so gross wie im Kontrollversuche vorgefunden. Aus den Tatsachen, dass im Hauptversuche der Harnstoff-N einerseits deutlich in einer grösseren Menge eingebüsst und der Ammoniak-N andererseits neugebildet wurde, als im Kontrollversuche, ist es höchst wahrscheinlich nachgewiesen, dass das Ammoniak unter Verbrauch des Harnstoffes gebildet wurde, weil in der durchgeströmten Lösung ausser dem Harnstoffe keine N-haltigen Substanzen enthalten waren, welche das Ammoniak hätten liefern können.

Der N in der Harnstofffraktion, welcher während der Durchblutung in der Menge von 36,66 mg in der Lösung verloren ging, wurde ausser dem Ammoniak-N, also der Harnstoff-N selbst, in der Magenwand und im Magensaft im Ganzen in der Menge von 30,87 mg zurückgefunden. Also ging der Harnstoff-N in der Menge von 14,55 mg in unbekannter Weise verloren, wobei das Resultat im Kontrollversuche in Rechnung gezogen wurde. Hier muss an die Ergebnisse im Durchblutungsversuche mit Blut erinnert werden. Damals ging der N in der Harnstofffraktion in der ganzen Menge von 52,00 mg im Blute verloren und wurde der N in der Ammoniakfraktion im Ganzen in der Menge von 16 mg vorgefunden, wobei die Ergebnisse im Kontrollversuche in Rechnung

gezogen wurden. Also blieb das Schicksal der fehlenden Menge von 36 mg Harnstoff unklar. Als Grund dafür kann es zum Teil möglich sein, dass der Harnstoff bei der Durchblutung wegen technischer Fehler ausserhalb des Untersuchungskreises blieb; ja gerade im Hauptversuche mit Lockescher Lösung wurden in der physiologischen Kochsalzlösung im Gefässe, in welches der Magen eingetaucht wurde, der Harnstoff-N mit 4,20 mg% und der Ammoniak-N mit 0,21 mg% und im Kontrollversuche in den beiden N-Fractionen immer in bestimmter Menge vorgefunden. Als anderen Grund gibt es eine Möglichkeit der chemischen Umsetzung des Harnstoffes, weil der Harnstoff mit Säuren, Salzen und Aldehyd sich leicht verbinden kann, worüber schon von Lichtwitz (1930) berichtet wurde. Da das Defizit des Harnstoffes im Versuche mit Blut viel grösser als im Versuche mit Lockescher Lösung vorgefunden wurde, lässt sich denken, dass der letztere Grund hier zur Geltung kommen könnte.

Dass eine ureatische Wirkung in der Magenschleimhaut existiert, wurde schon 1924 von Luck durch die Digestionsversuche mit dem Schleimhautstücke nachgewiesen, wobei nur einseitig das Ammoniak untersucht wurde, leider ohne den Harnstoff zu berücksichtigen, was sehr zu bedauern ist, weil es im Digestionsgemische ausser dem Harnstoff andere N-haltige Substanzen gibt, welche das Ammoniak liefern können. Zur Ergänzung des Versuches machte ich auch Digestionsversuche mit Schleimhautstücken des Hundemagens, wobei Schleimhautstücke der Cardia-, Fundus- und Pylorusteile geprüft wurden, um zu erfahren, ob es in der Verteilung der Urease lokale Verschiedenheiten gibt. In allen Versuchen mit den Schleimhäuten der 3 Abschnitte stieg der Wert des Ammoniak-N mit dem Zeitlaufe der Verdauung immer höher auf und eben so viel der des Harnstoff-N ab. Nach den Resultaten scheint es, dass die ureatische Wirkung in der Magenschleimhaut in allen Abschnitten sehr stark vor sich geht, aber im Pylorusteil in ihrer Stärke abnimmt und sogar in der Duodenalschleimhaut nicht mehr existiert. Beim Rückfluss des Duodenalsaftes in den Magen wurde die Wirkung im allgemeinen beeinträchtigt, worüber später eine Mitteilung folgen wird.

SCHLUSS :

1. Durch Durchblutungsversuche des Magens wurde nachgewiesen, dass eine *ureatische* Wirkung in der Magenwand existiert.

2. Durch *Digestionsversuche* der Magenschleimhaut wurde es bestätigt, dass die *Urease* in der Schleimhaut vom Cardia- und Fundusteile kräftiger ist als in der des Pylorusteiles. In der Duodenalschleimhaut wurde keine *Urease* nachgewiesen.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Durchströmungsversuche des Magens.

Der Magen des Nüchternhundes wurde mit Lockescher Lösung durchgeströmt. Die Durchströmungsmethode war ganz gleich derjenigen in den früheren Mitteilungen der Durchblutungsversuche des Magens.

Im Versuche wurde der Harnstoff in einer bestimmten Menge in die Lösung eingeführt und damit der Magen durchgeströmt. (Tabelle I und II).

Digestionsversuche der Magen- und Duodenalschleimhaut.

Der Nüchternhund wurde verblutet und der Magen mit Duodenum mit laufendem Wasser gut gewaschen. Die einzelnen Portionen der Schleimhaut, wobei die Magenschleimhaut in Cardia-, Fundus- und Pylorusteile getrennt bearbeitet wurde, wurde in Reibschale breiig zerrieben, und in der Menge von 5 gr. in einen Erlenmeyerschen Kolben gebracht, mit 0,85% Kochsalzlösung 50 cc. versetzt und mit wenig Chloroform stark geschüttelt und dann durch Gaze koliert. Das Kolat wurde immer in der Menge von 20 ccm mit Pufferlösung ($\frac{2}{3}$ Mol. Phosphatgemisch, dessen $\text{Ph} = 7,2$) 50 ccm Wasser 20 ccm und 2% Harnstofflösung 10 ccm in einen mit eingeschliffenem Glasstöpsel versehenen Kolben gebracht, gut gemischt und mit geringer Menge von Toluol geschichtet. Der Kolben stand bei 37°C. in einem Brutschrank. In bestimmten Zeitpunkten wurde das Gemisch auf Harnstoff und Ammoniak nach Van Slyke-Cullen(1914) untersucht. Natürlich wurde jedesmal bei der Untersuchung darauf geachtet, dass das Gemisch bakteriologisch steril war. (Tabelle III und IV).

TABELLE I. Kontrollversuche.

Nummer	Sex	K.G. (KG)	Menge des + zugeetzt. U (ca. mg)	Durch- strömungs- lösung (cc)	Druck in Hg Säule (mm)	Durch- strömungs- dauer (St.)	Lockesche Lösung				Mageninhalt		Muskelschicht		Schleimhaut- schicht			
							NH ₃ -N mg%	+ U-N mg%			Menge (cc)	NH ₃ -N mg%	U-N mg%	Menge (cc)	NH ₃ -N mg%	U-N mg%	Menge (cc)	NH ₃ -N mg%
							vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.
I	♂	12,4	0	300	20	2	0	0,56		0	0,28		0	0,28		0	0,28	
II	♂	16,5	0	300	20	3	0	0		0	0		0	0		0	0	
III	♀	12,8	0	300	20-15	3	0	0,28		0	0,28		0	0,28		0	0,28	
IV	♀	10,6	0	300	20-15	2,5	0	0,56		0	0,56		0	0,56		0	0,56	
Im Durchschnitt							0	0,35	+0,35	0	0,28	+0,28	0	0,28	+0,28	0	0,28	+0,28
Absolute Menge (mg)							0	1,05		0	0,84		0	0,84		0	0,84	

TABELLE II. Hauptversuche.

Nummer	Sex	K.G. (KG)	Menge des + zugeetzt. U (ca. mg)	Durch- strömungs- lösung (cc)	Druck in Hg Säule (mm)	Durch- strömungs- dauer (St.)	Lockesche Lösung				Mageninhalt		Muskelschicht		Schleimhaut- schicht			
							NH ₃ -N mg%	+ U-N mg%			Menge (cc)	NH ₃ -N mg%	U-N mg%	Menge (cc)	NH ₃ -N mg%	U-N mg%	Menge (cc)	NH ₃ -N mg%
							vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.	vor	nach	Diff.
I	♂	17,3	300	300	20	2	0	1,12		34,08	22,32		120	3,08	10,64	0	0	
II	♂	15,6	300	300	15	3	0	1,54		35,28	21,98		22	14,84	19,60	100	3,92	7,00
III	♀	16,0	300	300	20-15	2	0	1,68		35,28	22,40		20	8,96	1,68	120	3,68	4,48
IV	♀	13,3	300	300	20	3	0	3,92		34,08	22,96		25	18,48	0	130	3,08	3,08
V	♀	13,8	300	300	20-15	3	0	1,40		35,28	23,24		28	7,56	3,36	100	2,38	7,00
Im Durchschnitt							0	1,93	+1,93	34,80	22,58	-12,22	43	10,58	7,06	112	3,27	5,39
Absolute Menge (mg)							0	5,79		104,40	67,74		43	4,55	3,04	105	5,77	1,65

TABELLE III. Kontrollversuche.

K. I. 20 cc Schleimhautlösung + 50 cc Pufferlösung + 30 cc H₂O.
(Titration nach 1/10N)

		Sofort	5 st	10 st	24 st	48 st
Cardia	NH ₃ -N mg%	0	0	0	0	0
	+ U-N mg%	0	0	0	0	0
Fundus	NH ₃ -N mg%	0	0	0	0	0
	+ U-N mg%	0	0	0	0	0
Pylorus	NH ₃ -N mg%	0	0	0	0	0
	+ U-N mg%	0	0	0	0	0
Duodenum	NH ₃ -N mg%	0	0	0	0	0
	+ U-N mg%	0	0	0	0	0

K. II. 10 cc 2% ⁺U-lösung + 50 cc Pufferlösung + 40 cc H₂O.
(Titration nach 1/10N)

	Sofort	5 st	10 st	24 st	48 st
NH ₃ -N mg%	0	0	0	0	0
+ U-N mg%	64.4	67.2	61.6	61.6	64.4

K. III. 20 cc Muskelschichtlösung + 50 cc Pufferlösung + 10 cc 2% ⁺U-lösung
+ 20 cc H₂O.
(Titration nach 1/10N)

		Sofort	5 st	10 st	24 st	48 st
NH ₃ -N mg%	Cardia	0	0	0	0	0
	Fundus	0	0	0	0	0
	Pylorus	0	0	0	0	0
	Duodenum	0	0	0	0	0

TABELLE IV. Hauptversuche.

		Fall I.				Fall II.				Fall III.			
		Sofort	10 St.	24 St.	48 St.	Sofort	5 St.	10 St.	24 St.	Sofort	5 St.	10 St.	24 St.
Cardia	NH ₃ -N mg%	0	36.4	53.2	64.4	0	12.6	19.6	39.2	0	21.0	33.6	36.4
	+ U-N mg%	70.0	30.8	14.0	0	61.6	43.4	33.6	23.4	58.8	40.6	25.2	19.6
Fundus	NH ₃ -N mg%	0	53.2	56.0	64.4	0	14.0	26.2	39.2	0	25.2	39.2	42.0
	+ U-N mg%	67.2	25.2	0	0	67.2	50.4	41.0	22.4	56.0	30.8	18.2	16.8
Pylorus	NH ₃ -N mg%	0	9.8	19.6	43.4	0	9.8	14.0	35.0	0	4.2	5.6	11.6
	+ U-N mg%	72.8	58.6	50.4	9.8	58.8	46.2	42.0	15.4	58.8	57.4	53.2	50.0
Duo- denum	NH ₃ -N mg%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+ U-N mg%	67.2	72.8	70.0	67.2	53.2	56.0	61.6	61.6	61.6	67.2	64.4	61.6

(Titration nach 1/10N)

		Fall IV.				Fall V.				Fall VI.			
		Sofort	5 St.	10 St.	24 St.	Sofort	5 St.	10 St.	24 St.	Sofort	5 St.	10 St.	24 St.
Cardia	NH ₃ -N mg%	0	18.2	40.6	60.2	0	40.6	46.2	56.0	0	4.2	4.2	19.6
	+ U-N mg%	53.2	37.2	21.0	4.2	56.0	18.2	12.6	0	67.2	57.4	54.6	47.6
Pylorus	NH ₃ -N mg%	0	14.0	26.6	63.0	0	44.8	47.6	56.0	0	4.2	5.6	15.4
	+ U-N mg%	58.8	42.0	32.2	4.2	61.6	16.8	22.4	5.6	64.4	63.0	56.0	46.2
Fundus	NH ₃ -N mg%	0	11.2	19.6	56.0	0	2.8	2.8	7.0	0	1.4	1.4	1.4
	+ U-N mg%	67.2	53.2	33.6	8.4	61.6	61.6	61.6	54.6	67.2	63.0	60.2	63.0
Duo- denum	NH ₃ -N mg%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	+ U-N mg%	64.4	67.2	61.6	67.2	67.2	70.0	67.2	61.6	64.4	64.4	61.6	58.8

(Titration nach 1/10N) Beim VI. Fall war die Schleimhaut im allgemeinen sehr uneben und gelblich verfärbt.

LITERATUR.

- Lichtwitz (1930): Klinische Chemie, 2 Auflage, 101.
Luck, Murray, J. (1924): The Biochemical Journal, **18**, 1227.
Simici, D., Vladesco, R. et Popesco, M. (1929 u. 1931): Berichte
über die gesamte physiol. u. experim. Pharmakologie, **51**, 730 u. **60**, 578.
Ich, Sumida, S. (1934): The Journal of Biochemistry, **19**, 449.
Van Slyke, C. (1914): The Journal of biolog. Chemistry, **19**, 211.
Yoshida, Y. und Sumida, S. (1933): Nagasaki Igakkwai Zassi, **11**, 270.

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS DER LEBER-DIATHERMIE AUF DIE LEBERFUNKTION.

I. Über den Einfluss der Leber-Diathermie auf die Gallensekretion.

VON

YOSHIO MITANI.

(Aus der medizinischen Klinik der Kaiserlichen Universität zu Sapporo.
Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.)

(Eingegangen am 10. November 1934)

EINLEITUNG.

Seit Einführung der Leberdiathermie in die Medizin wurde sie manchmal zur Behandlung der Leber-Gallenwege-Erkrankungen angewendet. So wurde sie, seitdem Laqueur (1908) und Nagelschmidt (1909) Cholelithiasis ohne Steinverschluss sowie Cholecystitis zu den Indikationen der Diathermiebehandlung gezählt hatten, bei Leberkrankheiten von vielen Autoren am Krankenbette verwendet. So hat, soweit ich die mir zur Verfügung stehenden Literatur einsehen konnte, Grube (1918) bei Gallenblasenentzündung und Gallensteinleiden, Hirsch (1925) bei Gallenblasenerkrankungen, Bassler (1926) bei Leberzirrhose, Frisch (1928) bei Leberkrankheiten, Budarin und Dragol (1930) bei Cholecystitis, Pagniez (1930) bei alkoholischer Leberzirrhose, Iacono (1931) bei chronischen Lebererkrankungen (Leberzirrhose und Hepatitis), Goldgruber (1932) bei Leberparenchymerkrankungen, und Oelsnitz (1933) bei Leberzirrhose die Diathermie auf die Leber angewendet. Diese Autoren stimmen darin völlig überein, dass die Leber-Gallenwege-Erkrankungen durch diese Behandlungsweise sehr günstig beeinflusst werden. Aber diese Publikationen beziehen sich hauptsächlich auf klinische Beobachtungen, welche nicht auf tierexperimentelle Grundlagen basierten.

Was den Einfluss der Diathermie auf die Gallensekretion in

experimentellen Untersuchungen anbelangt, so liegen nur wenige Literaturangaben vor. Nagelschmidt soll Tierversuche angestellt haben, mit dem Ergebnisse, dass sich die Gallensekretion durch die Leberdiathermie sowohl quantitativ als auch qualitativ vermehrte, aber leider vermissen wir seine näheren Versuchsprotokolle. Ausser dieser Angabe konnte ich diesbezüglich nur Angaben von Karapetjan (1933) und Kunioka (1932) in der Literatur finden. Der erstere Autor wendete die Leberdiathermie bei Gallenblasenfistelhunden an, und beobachtete, wie sich die Gallenmenge, der Wassergehalt, der feste Rest, organische und anorganische Stoffe der Galle in der 5-Stunden-Galle verändern. Er fasste hierbei seine Resultate folgendermassen zusammen:

1. Der Gallenabfluss wird durch Diathermiebehandlung gesteigert.

2. Der Wassergehalt der Galle nimmt zu.

3. Prozentuell nimmt der feste Stoff (organische und anorganische Bestandteile) der Galle ab.

4. Die Ausscheidung aus dem Organismus von organischen und anorganischen Stoffen durch die Galle, in absoluten Werten gerechnet, nimmt bedeutend zu.

Im Gegensatz hierzu stellte Kunioka (1932) an Kaninchen mit akuter Choledochusfistel Versuche an, und kam zu dem Schluss, dass die Gallensekretion durch die Leberdiathermie bei einem Teile der Versuchstiere in ziemlich hohem Grade abnimmt, während sie beim anderen kaum beeinflusst wird. Die beiden Autoren stimmen daher in dem Einfluss der Leberdiathermie auf die Gallensekretion nicht überein. Und da in beiden Versuchen gar nicht berührt ist, wie die spezifischen Bestandteile der Galle durch Leberdiathermie beeinflusst werden, habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Nakagawa genaue Untersuchungen über dieses Thema angestellt.

VERSUCHSANORDNUNG.

Als Versuchstiere dienten ausschliesslich Hunde, welchen eine permanente Gallenblasenfistel angelegt wurde. Nachdem die Hunde nach Verheilung der Operationswunde an die Leberdiathermie gewöhnt waren, stellte ich erst die eigentlichen Versuche an. Bei

der Stromanwendung wurden zwei Bleielektroden von je 8×13 qcm benutzt, die eine in der Gallenblasengegend und die andere am gegenüberliegenden Punkte des Rückens. Die Haut wurde vorher glatt abrasiert.

Die Stromstärke, welche in unseren Versuchen Anwendung fand, war 400–1500 mA. Die Galle sammelte ich alle 30 Minuten, um die etwaigen geringen Veränderungen klarstellen zu können. Zuerst stellte ich damit die Gallenmenge fest, untersuchte dann das Bilirubin mittels der Kumekawaschen Koffeinmethode und die Gallensäure mit Hilfe der Nakagawaschen roten Mikromethode.

Die Vorbereitungen der Versuchstiere und die Versuchsbedingungen, wie sie von Sakamoto in unserer Klinik angegeben wurden und welche zu der Bestimmung der Gallensäure nötig sind, wurden streng durchgeführt.

VERSUCHSERGEBNISSE.

Vor den eigentlichen Versuchen stellte ich zahlreiche Kontrollversuche an und stellte fest, dass, wenn die Versuchsbedingungen streng eingehalten werden, die Gallenmenge während mehrerer Stunden fast konstant bleibt und die in einer Zeiteinheit sezernierten absoluten Mengen des Bilirubins sowie der Gallensäure stundenlang auf einer konstanten Höhe stehen. In diesem Punkte stimme ich Sakamoto und Mikami von unserer Klinik vollkommen bei, deswegen habe ich, um Raum zu sparen, darauf verzichtet, hier meine experimentellen Daten tabellarisch anzugeben.

I. Diathermie auf die gesunde Leber.

Im Anfange der Versuche wendete ich die Diathermie in relativ geringen Umfange an (400–500 mA, 30 Minuten). Von mehreren Versuchsergebnissen, welche immer gleich ausfielen, werde ich, um Raum zu sparen, nur eines in Tabelle I angeben.

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, nimmt die Gallenmenge schon während der Diathermisierung zu und demzufolge nehmen das Bilirubin und die Gallensäure in ihrer Konzentration ab. Aber wenn man die in einer Zeiteinheit sezernierte absolute Menge betrachtet, so ist die Zunahme des Bilirubins sowie der Gallensäure

TABELLE I.
Hund ♀ 15 kg.

Nr.	Menge (30') cem	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	mg%	absolute Menge		
1	3.1	90.0	2.8	940	29.1	10.4	500-400mA 30'
2	2.8	93.0	2.6	1030	28.8	11.0	
3	4.5	80.0	3.6	770	34.7	9.6	
4	4.0	80.0	3.2	820	32.8	10.2	
5	3.7	86.0	3.2	960	25.5	11.4	
6	3.2	86.0	2.8	830	28.1	10.0	
7	3.4	86.0	2.9	950	32.6	11.2	
8	3.0	90.0	2.7	980	29.4	10.8	
9	2.8	95.0	2.7	930	27.5	10.1	
10	3.0	95.0	2.9	1060	31.8	10.9	
11	3.0	95.0	2.8	1060	30.7	10.9	
13	3.7	106.0	2.9	1110	29.9	10.4	

Hund ♂ 13 kg.

1	1.4	126.0	1.8	1030	15.1	8.3	500-400mA 30'
2	1.5	126.0	1.9	1130	16.9	8.8	
3	3.0	98.0	2.9	800	24.0	8.3	
4	1.8	119.0	2.1	890	16.0	7.6	
5	1.7	130.0	1.9	1010	17.2	9.0	
6	1.6	128.0	1.9	1100	16.5	8.7	
7	1.4	120.8	1.8	1060	15.8	8.7	
8	1.5	133.0	2.0	1010	15.2	7.6	
9	1.6	141.4	2.2	1060	16.8	7.6	
10	1.5	140.0	2.1	1060	15.8	7.5	
11	1.5	147.0	2.2	1180	17.7	8.0	
12	1.4	152.6	2.1	1230	17.1	8.1	

sehr auffallend. Diese Erscheinung ist jedoch, wie aus der Sekretionskurve ersichtlich, nicht der eigentlichen vermehrten Sekretion derselben zuzuschreiben, sondern ist durch vis a tergo zu erklären.

Darauf wendete ich die Diathermie in stärkerem Masse an.

Als die Leber mit 600–700 mA 30 Minuten lang diathermisiert wurde, wurde die Gallensekretion in gleicher Weise beeinflusst, wie oben beschrieben ist. Aber es schien in diesem Falle, als ob die absoluten Mengen von Bilirubin sowie von Gallensäure während einiger Stunden vermehrt würden. So wandte ich, um die Frage noch klarer zu entscheiden, die Diathermie in noch grösserer Intensität an. Die hierbei gewonnenen Resultate sind in Tabelle II angegeben.

TABELLE II.
Hund ♀ 15 kg.

Nr.	Menge (30') ccm	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	mg%	absolute Menge		
1	2.5	98.4	2.6	1176	29.3	11.3	1000mA 30'
2	2.5	102.0	2.6	1176	29.3	11.3	
3	4.2	86.4	3.6	960	39.3	10.2	
4	3.4	90.0	3.1	900	30.6	9.9	
5	3.8	96.0	3.7	1020	38.8	10.5	
6	3.6	106.8	3.8	1020	37.4	9.8	
7	3.6	110.4	4.0	1044	36.7	9.1	
8	3.3	110.4	3.6	1020	33.7	9.3	
9	3.5	110.4	3.8	980	32.3	8.3	
10	3.0	96.0	2.9	1044	31.3	10.1	
11	2.4	92.4	2.2	1080	25.9	11.8	
12	2.6	98.4	2.6	1152	29.9	11.5	
13	2.5	99.4	2.5	1152	28.9	11.4	

Wenn man die Leber mit 1000 mA 30 Minuten diathermisiert, so vermehrt sich die Gallenmenge von Anfang an deutlich, und diese Vermehrung setzt sich 3,5 Stunden fort. Die Konzentrationen des Bilirubins und der Gallensäure nehmen mit dem Eintritt der Choleresese ab. Aber die Abnahme derselben läuft nicht pararell mit der vermehrten Gallenmenge, so dass sowohl das Bilirubin als auch die Gallensäure in ihrer absoluten Menge während 3 Stunden auffallend zunehmen.

TABELLE III.
Hund ♂ 13 kg.

Nr.	Menge (30') ccm	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	mg%	absolute Menge		
1	2.5	84.0	2.1	1188	29.7	14.1	1500-1000mA 60'
2	2.6	80.4	2.1	1166	30.7	14.4	
3	4.3	68.4	3.0	979	42.1	14.0	
4	6.0	61.2	3.6	825	49.5	13.7	
5	3.2	78.0	2.5	902	28.9	11.6	
6	3.5	80.4	2.8	1034	36.2	12.9	
7	4.1	80.4	3.3	957	39.2	11.9	
8	3.8	81.6	3.1	1100	41.8	13.1	
9	3.0	88.8	2.7	1144	34.3	12.8	
10	3.3	86.4	2.8	1144	37.8	13.5	
11	3.0	86.4	2.6	1078	32.3	12.4	
12	2.2	90.0	2.0	1221	26.9	13.4	
13	2.4	80.4	2.0	1243	29.8	14.9	
14	2.1	93.4	1.9	1221	25.6	13.5	

Hund ♀ 16 kg.

1	2.1	64.0	1.3	1010	21.2	16.3	1500mA 30'
2	2.3	60.8	1.4	1090	24.0	17.1	
3	4.1	56.0	2.3	770	31.6	13.7	
4	3.3	58.2	1.9	850	28.0	14.7	
5	3.0	62.4	1.9	980	29.4	15.4	
6	3.7	62.4	2.3	750	27.8	12.1	
7	2.9	57.6	1.7	770	22.0	12.9	
8	2.6	68.0	1.8	1130	29.4	16.3	
9	2.8	67.2	1.9	1130	31.6	16.6	
10	2.8	62.4	1.8	1180	32.0	17.7	
11	2.4	65.6	1.6	850	20.4	12.8	
12	2.6	62.4	1.6	820	21.3	13.3	
13	2.1	65.6	1.4	1080	22.7	16.2	
14	2.4	57.6	1.4	950	22.8	16.2	
15	2.0	72.0	1.4	820	16.4	11.8	
16	1.9	72.0	1.4	900	17.1	12.0	
17	2.2	65.6	1.3	1080	13.7	17.4	
18	2.5	57.6	1.4	1080	27.0	19.0	

Diese Erscheinungen traten noch deutlicher zu Tage, als die Intensität der Diathermie bis zu 1000–1500 mA 30–60 Minuten gesteigert wurde. Hierbei dauerte die vermehrte Gallensekretion bis zur 4. Stunde und die absolute Menge des Bilirubins sowie der Gallensäure nahm während 4 Stunden zu. Die Quotienten zwischen beiden Gallenbestandteilen blieben im grossen und ganzen kaum beeinflusst.

Kurz zusammengefasst, bei der Leberdiathermie treten, wenn die Intensität der Diathermie genügend ist, eine vermehrte Gallensekretion und eine absolute Zunahme des Bilirubins und der Gallensäure auf. Diese Erscheinungen treten deutlicher und in längerer Dauer zu Tage, wenn die Leber in grösserer Intensität und längere Zeit diathermisiert wird. Die Leberdiathermie kann deswegen eine Nachwirkung haben.

II. Kombinierte Anwendung der Leberdiathermie mit Atropin oder Adrenalin.

Nachdem es klar festgestellt ist, was für einen Einfluss die Leberdiathermie auf die Gallensekretion ausüben kann, bin ich zu weiteren Untersuchungen übergegangen, um festzustellen, in welcher Weise die durch Leberdiathermie hervorgerufenen Veränderungen in der Gallensekretion durch Atropin oder Adrenalin beeinflusst werden.

Nun habe ich den Gallenblasenfistelhunden 2 ccm einer 0,1%igen Atropinlösung intravenös verabreicht und nach 30 Minuten mit 600 mA 30 Minuten lang die Leber diathermisiert. Hierbei konnten keine Veränderungen in der Gallenmenge sowie in der absoluten Menge des Bilirubins und der Gallensäure festgestellt werden.

Bei den Versuchen mit Adrenalin war das Verhältnis ganz das gleiche wie bei denen mit Atropin. Die Leberdiathermie, welche 30 Minuten nach der subkutanen Injektion von 1 ccm einer 0,1%igen Adrenalinlösung in der Intensität von 600 mA 30 Minuten lang ausgeführt wurde, rief keine Zunahme der Gallensekretion hervor. Diese Versuche habe ich mehrere Male wiederholt, immer mit dem gleichen Resultate, wie aus Tabelle IV–

TABELLE IV.
Hund ♀ 15 kg.

Nr.	Menge (30') cem	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	mg%	absolute Menge		
1	1.5	210.0	3.2	2220	33.3	10.4	Atropin 2 cem intravenös 600mA 30'
2	1.5	220.0	3.3	2244	33.6	10.2	
3	1.4	228.0	3.2	2004	28.0	8.7	
4	1.5	250.0	3.7	2064	31.0	8.4	
5	1.4	262.0	3.6	2304	32.3	9.0	
6	2.5	188.0	4.7	2184	44.6	9.5	
7	1.4	222.0	3.1	2220	31.0	10.0	
8	1.0	228.0	2.3	2220	22.2	9.6	
9	1.0	236.0	2.4	2280	22.8	9.5	
10	1.1	250.0	2.8	2244	24.7	9.0	
11	1.2	242.0	2.9	2220	26.6	9.1	
12	1.4	222.0	3.1	2304	32.3	10.4	

VII klar ersichtlich ist.

Es ist also der Schluss zu ziehen, dass die durch Leberdiathermie hervorzurufenden Veränderungen in der Gallensekretion bei der vorherigen Verabreichung von Atropin oder Adrenalin sehr schwer zu Tage treten.

III. Diathermie auf Pathologische Leber.

Obwohl in den oben erwähnten Versuchen klar gestellt ist, dass die Leberdiathermie auf die Gallensekretion begünstigend einwirken kann, so kann man doch nicht ohne weiteres den Schluss ziehen, dass sie auch auf die pathologische Leber in gleicher Weise einwirke. Diese Frage ist erst dann gelöst, wenn die experimentellen Untersuchungen in dieser Richtung ausgeführt worden sind. Es liegt aber zu unserem Erstaunen noch keine dahin gerichtete Angabe in der Literatur vor.

Inzwischen stand mir zufällig ein schwangerer Hund zur Verfügung. Bei der Schwangerschaft, insbesondere gegen Ende der-

TABELLE V.
Hund ♂ 10 kg.

Nr.	Menge (30') cem	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	% Su	absolute Menge		
1	1.0	195.0	1.9	2960	29.6	15.6	Adrenalin 1 cem subkutan 600mA 30'
2	0.9	195.0	1.8	3150	28.4	15.7	
	0.7	240.0	1.7	4125	28.8	16.9	
3							
4	0.7	228.0	1.6	4250	29.8	18.3	
5	0.7	334.0	2.3	5000	35.0	15.2	
6	0.5	340.0	1.7	5100	25.5	15.0	
7	0.4	275.0	1.1	3900	15.6	14.2	
8	0.7	252.0	1.8	4620	32.3	17.9	
9	1.1	266.2	2.9	3350	36.9	13.0	
10	0.5	294.0	1.5	4400	22.0	14.6	
11	0.6	230.0	1.4	4040	24.2	17.2	
12	0.7	210.0	1.5	3300	23.1	15.4	
13	0.8	194.0	1.6	3120	25.0	15.6	
14	0.9	214.0	1.9	3060	27.5	14.5	

TABELLE VI.

Hund ♂ 13 kg.

Hund ♀ 16 kg.

Hund ♂ 10 kg.

Nr.	Menge (30') cem	Bemerkungen	Nr.	Menge (30') cem	Bemerkungen	Nr.	Menge (30') cem	Bemerkungen
1	2.0	Atropin 1 cem intravenös 800mA 30'	1	2.6	Atropin 1 cem subkutan 800mA 30'	1	1.0	Atropin 1 cem subkutan 600mA 30'
2	2.0		2	2.6		2	0.9	
3	2.1		3	2.3		3	1.1	
4	0.8		4	2.6		4	1.0	
5	0.9		5	2.5		5	1.0	
6	1.0		6	2.6		6	1.3	
7	0.8		7	2.9		7	1.2	
8	2.2		8	2.4		8	1.1	
9	2.1		9	3.0		9	1.5	
10	1.9		10	2.3		10	0.8	
11	2.0		11	2.5		11	0.9	
12	2.3		12	2.1		12	1.2	

TABELLE VII.

Hund ♀ 16 kg.			Hund ♂ 16 kg.		
Nr.	Menge (30') ccm	Bemerkungen	Nr.	Menge (30') ccm	Bemerkungen
1	3.5	Adrenalin 1ccm subkutan	1	1.7	Adrenalin 1ccm subkutan 1000-700mA 30'
2	3.4		2	1.3	
3	3.4		3	1.4	
4	3.2	900mA 30'	4	1.0	
5	3.4		5	1.1	
6	3.0		6	1.4	
7	2.6		7	0.9	
8	3.2		8	1.3	
9	3.8		9	1.3	
10	3.3		10	2.0	
11	3.0		11	1.1	
12	2.9		12	1.4	

selben sind bekanntermassen die Leberfunktionen in mannigfaltiger Weise geschädigt. Deswegen führte ich, um die oben erwähnte Frage zu entscheiden, die Leberdiathermie an dem schwangeren Hunde kurz vor der Entbindung und im Wochenbett aus.

In dem Versuche, wo die Leber in einer Stärke von 1000 mA 30 Minuten lang und zwar 2 Tage vor der Entbindung diathermisiert wurde, nahm die Gallenmenge deutlich zu, aber das Bilirubin und die Gallensäure blieben, ausgenommen von der durch vis a tergo hervorgerufenen ganz vorübergehenden Vermehrung, kaum beeinflusst.

Als ich aber die Leber am 4. Tage des Wochenbettes in einer Intensität von 1000 mA eine halbe Stunde diathermisierte, war das Resultat fast das gleiche wie in dem ersteren Versuche. Wenn sich auch die Gallenmenge vermehrte, wurden das Bilirubin sowie die Gallensäure keiner Veränderung unterworfen.

Nächst dem wollte ich an dem Hunde, welchem die Leber auf künstliche Weise geschädigt wurde, Versuche anstellen. Hierbei habe ich als Lebergift Toluyldiamin subkutan injiziert. Die

TABELLE VIII.

Hund ♀ 18 kg. (am 2. Tage vor Geburt).

Nr.	Menge (30') cem	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	mg%	absolute Menge		
1	1.9	107.2	2.0	1104	20.9	10.2	1000mA 30'
2	2.0	107.2	2.1	1160	23.2	10.8	
3	2.0	102.0	2.0	1240	24.9	12.4	
4	4.6	70.0	3.2	848	38.2	11.9	
5	2.8	78.0	2.2	768	21.5	9.8	
6	3.0	88.0	2.6	976	29.3	11.2	
7	2.4	84.0	2.0	1144	27.5	13.7	
8	2.3	88.0	2.0	968	22.3	11.1	
9	2.5	98.0	2.4	1000	25.0	10.4	
10	2.3	98.0	2.3	1040	23.9	10.4	
11	2.2	96.0	2.1	1003	22.6	10.7	
12	2.3	100.0	2.3	1008	23.2	10.1	
13	2.0	100.0	2.0	1104	22.1	11.0	
14	1.7	112.0	2.4	1240	21.1	9.0	
15	2.0	95.0	1.9	1145	22.9	12.0	
16	2.1	92.0	1.9	1160	24.4	12.3	
17	2.3	95.0	2.2	904	20.8	9.5	
18	1.9	120.0	2.3	968	18.4	9.7	

TABELLE IX.

Hund ♀ (am 4. Tage des Wochenbettes).

Nr.	(30') cem mg%	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	Menge	absolute Menge		
1	2.6	93.6	2.4	1080	28.1	11.8	1000mA 30'
2	2.5	86.4	2.3	1104	27.6	12.0	
3	4.2	80.4	3.4	936	39.3	11.5	
4	3.2	88.8	2.9	760	24.3	8.4	
5	3.2	91.2	2.9	688	22.0	7.6	
6	3.1	91.2	2.8	960	29.8	10.7	
7	2.6	84.0	2.2	840	21.8	10.0	
8	2.7	96.0	2.6	920	24.8	9.5	
9	2.8	91.2	2.6	888	24.9	9.5	
10	2.8	91.2	2.6	808	22.6	8.7	
11	2.9	88.8	2.5	840	24.4	9.8	
12	2.8	87.6	2.4	888	24.9	10.3	
13	2.6	91.2	2.4	984	25.6	10.6	
14	3.0	87.6	2.6	928	27.8	10.6	
15	2.5	96.0	2.4	1024	25.6	10.6	
16	2.4	90.0	2.3	968	23.4	10.5	

Resultate stellte ich in Tabelle X zusammen.

Am ersten Tage nach der subkutanen Injektion von Toluylendiamin (0,02 g pro Kg) kam die Galle in noch genügender Menge

TABELLE X.
Hund ♀ 16 kg.
Der vorhergehende Tag

Nr.	Menge (30') ccm	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	mg%	absolute Menge		
1	2.0	80.4	1.6	1212	24.2	15.1	
2	2.5	61.2	1.5	1068	26.7	17.8	
3	2.7	68.4	1.8	1068	28.8	16.0	

Toluylendiamin
0.32 g subkutan

Der 1. Tag

1	2.8	31.8	0.89	225	6.3	7.1	
2	2.2	34.2	0.75	294	6.5	8.6	
3	4.0	30.0	1.20	196	7.8	6.5	1000mA 30'
4	1.8	30.6	0.55	290	5.2	9.4	
5	1.6	31.8	0.51	370	5.9	11.5	
6	2.0	33.0	0.66	435	8.7	13.1	
7	1.9	30.6	0.58	429	8.0	13.7	
8	2.1	27.6	0.58	333	7.0	12.0	Bilirubin 1.2 mg%

Der 2. Tag

1	0.7	84.0	0.59	520	3.6	6.1	
2	1.0	72.0	0.72	505	5.0	6.9	
3	0.7	73.6	0.52	460	3.2	6.1	
4	1.1	60.6	0.67	524	5.8	8.6	1000mA 30'
5	1.0	65.6	0.66	585	5.9	8.9	
6	0.8	72.0	0.57	805	6.4	11.2	
7	0.6	84.0	0.67	910	5.5	8.2	
8	1.0	68.0	0.68	546	5.5	8.0	
9	1.2	80.0	0.96	680	8.2	8.5	Bilirubin 2.4 mg%

Einfluss der Leber-Diathermie auf die Leberfunktionen.—I. 321

Der 3. Tag

1	2.1	114.0	2.4	1305	27.4	11.4	1000mA 30'
2	1.9	108.0	2.1	1150	21.9	10.4	
3	2.0	95.0	1.9	1060	21.2	11.1	
4	2.1	100.0	2.1	1130	23.7	11.3	
5	2.1	105.0	2.2	1080	22.7	10.3	
6	1.9	98.0	1.9	1280	24.3	12.7	
7	2.3	92.0	2.1	1200	26.7	12.7	
							Bilirubin 1.0mg%

Der 4. Tag

1	1.8	72.0	1.4	900	16.2	11.6	1500mA 30'
2	1.6	73.6	1.2	1100	17.2	14.6	
3	1.5	81.6	1.2	1060	15.9	13.2	
4	2.9	76.0	2.2	1040	30.2	13.2	
5	2.0	80.0	1.6	1010	20.2	12.6	
6	2.2	78.4	1.8	940	20.7	11.5	
7	2.0	74.4	1.5	920	18.4	12.2	
8	1.5	60.8	0.9	740	11.1	12.3	
9	1.3	64.0	0.8	800	10.4	13.0	
							Bilirubin unmessbar

Der 5. Tag

1	2.7	64.0	1.7	930	25.1	14.7	1000mA 60'
2	2.5	65.6	1.6	980	24.5	15.3	
3	3.3	65.6	2.1	960	31.5	15.1	
4	4.0	72.0	2.9	800	32.0	11.0	
5	2.6	80.0	2.1	880	22.9	10.9	
6	3.4	78.0	2.6	700	23.8	9.1	
7	3.2	74.4	2.3	700	22.4	9.7	
8	2.8	74.4	2.1	700	21.6	10.3	
9	2.6	80.0	2.1	820	21.3	10.1	

Der 6. Tag

1	2.1	60.4	1.3	980	20.6	15.8	1000mA 30'
2	2.0	59.2	1.2	1010	20.2	16.8	
3	3.5	57.6	2.0	850	29.7	14.8	
4	2.5	59.2	1.5	800	20.0	13.3	
5	2.7	61.4	1.7	960	25.9	15.2	
6	2.8	57.6	1.6	1010	28.3	15.0	
7	3.2	60.4	1.9	850	27.2	14.3	
8	2.5	61.4	1.5	920	23.0	15.5	

heraus, aber die Konzentrationen des Bilirubins und der Gallensäure sanken, im Vergleiche mit denen vor der Injektion, merklich ab. Auch die absoluten Mengen der beiden Stoffe nahmen in auffallender Weise ab. Hierbei ist die Gallensäure in viel höherem Grade wie das Bilirubin herabgesetzt, so dass der Quotient zwischen beiden Bestandteilen auffallend absteigt. Hierin stimme ich mit den Resultaten von Fujikawa in unserer Klinik völlig überein, der diese Veränderungen in den experimentellen Untersuchungen zum ersten Male feststellte.

In diesem Zustande konnte ich durch Leberdiathermie (1000 mA, 30 Minuten) vorübergehend eine geringe Vermehrung der Gallenmenge konstatieren, ohne jedoch irgendeinen Einfluss auf die Sekretion des Bilirubins sowie der Gallensäure zu bemerken.

Am zweiten Tage nahm die Störung des Gallenabflusses, wie aus dem Bilirubinwert im Blute ersichtlich, deutlich zu. Die Sekretion der Galle sowie deren zwei Hauptbestandteile stehen noch auf einer niederen Höhe. Die Leberdiathermie brachte hierbei keine Wirkung auf die Sekretion des Bilirubins sowie der Gallensäure hervor.

Am dritten Tage kehrte die Sekretion der Galle und deren Bestandteile zur Norm zurück und der Bilirubinwert in Serum begann abzunehmen. Trotzdem blieb die Leberdiathermie vollkommen wirkungslos. Am Vierten Tage wurde das Serum-Bilirubin so tief, dass es nicht mehr zu messen war. Hier konnte man erst die günstige Wirkung der Leberdiathermie auf die Gallensekretion konstatieren. Die Gallenmenge nahm zu und das Bilirubin sowie die Gallensäure wurde vermehrt ausgeschieden. An dem folgenden Tage wirkte die Leberdiathermie auf die Gallensekretion begünstigend ein in gleicher Weise wie bei der gesunden Leber.

Den auf gleiche Weise angeordneten Versuch stellte ich an einem anderen Hunde an (Tabelle XI). Trotzdem Toluylendiamin in gleicher Dosis wie im ersteren Versuche subkutan verabreicht wurde, wirkte es hier als Lebergift viel intensiver. Am ersten und zweiten Tage nach Toluylendiamininjektion sanken die Gallenmenge sowie die Sekretion des Bilirubins und der Gallensäure fast

TABELLE XI.
Hund ♂ 10 kg.
Der vorhergehende Tag

Nr.	Menge (30') ccm	Bilirubin		Gallensäure		G/B	Bemerkungen
		mg%	absolute Menge	mg%	absolute Menge		
1	1.7	63.0	0.95	1820	27.3	28.7	
2	1.9	59.0	1.12	1770	31.8	28.3	

Toluylendiamin
0.2 g subkutan

Der 1. Tag

1	0.1	—	—	40	0.12	—	1000mA 30'
2	0.3	4.0	0.01	56	0.17	17.0	
3	0.15	—	—	53	0.08	—	
4	0.2	—	—	48	0.10	—	
5	—	—	—	—	—	—	
6	0.1	—	—	50	0.05	—	Bilirubin 4.5 mg%

Der 2. Tag

1	0.2	—	—	71	0.14	—	1000mA 30'
2	0.1	—	—	83	0.08	—	
3	—	—	—	—	—	—	
4	0.1	—	—	90	0.09	—	
5	0.15	—	—	86	0.13	—	
6	0.05	—	—	75	0.04	—	Bilirubin 5.0 mg%

Der 3. Tag

1	0.6	20.4	0.12	615	3.7	30.8	1000mA 30'
2	0.4	25.2	0.10	836	3.4	34.0	
3	0.8	26.7	0.22	576	4.6	20.9	
4	0.5	25.2	0.13	600	3.0	23.1	
5	1.3	29.6	0.39	544	7.1	20.0	
6	0.6	22.8	0.14	740	4.4	31.4	
7	0.9	22.8	0.22	531	4.8	21.8	
8	0.7	38.0	0.27	780	5.5	20.4	Bilirubin 2.3 mg%

Der 4. Tag

1	1.3	73.6	0.96	1800	23.4	24.3	1000mA 30'
2	1.1	72.0	0.79	1776	19.5	24.6	
3	1.2	75.2	0.90	1752	20.2	22.4	
4	0.6	86.4	0.52	2064	12.4	23.8	
5	1.0	90.4	0.90	2016	20.2	22.4	
6	1.2	70.4	0.84	1764	21.2	25.2	Bilirubin 1.6 mg%
7	1.4	76.0	1.06	1800	25.2	23.7	

Der 5. Tag

1	1.7	92.0	1.56	1570	26.7	17.1	1000mA 30'
2	2.0	84.0	1.68	1600	32.0	19.0	
3	2.8	78.0	2.18	1500	42.0	19.2	
4	2.6	80.0	2.08	1480	38.4	18.4	
5	1.9	86.0	1.63	1720	32.7	20.0	
6	2.0	92.0	1.84	1670	33.4	18.1	Bilirubin 1.04 mg%
7	2.2	86.0	1.89	1570	34.5	18.2	
8	1.8	90.0	1.62	1600	28.8	17.7	

Der 6. Tag

1	1.3	67.0	0.87	2002	26.0	29.8	1500mA 30'
2	1.6	61.0	0.98	1960	31.3	31.9	
3	2.4	59.0	1.42	1680	41.3	28.3	
4	2.3	63.0	1.45	1680	38.6	26.7	
5	2.0	63.0	1.45	1834	36.6	28.8	
6	1.2	69.0	0.83	2141	25.7	30.9	Bilirubin unmessbar
7	1.5	57.0	0.86	1932	28.8	33.4	
8	1.9	65.0	1.24	1890	35.9	29.0	

bis auf Null herab. Die Leberdiathermie blieb während dieser Tage völlig wirkungslos. Am dritten Tage begann die Sekretion der Galle und deren Hauptbestandteile sich etwas zu erholen und der Bilirubinwert im Serum etwas abzunehmen. Am vierten Tage, wo der Serum-Bilirubinwert noch immer tiefer wurde, kehrte die Ausscheidung der Galle sowie deren Bestandteile fast zur Norm

zurück. Aber die Leberdiathermie konnte während dieser Tage noch nicht günstig einwirken. Am 5. und 6. Tage, wo die Gallensekretion fast normal ablief, war man erst imstande, die günstige Wirkung der Leberdiathermie zu konstatieren.

Kurz zusammengefasst, die Leberdiathermie kann auf die Gallensekretion der pathologisch veränderten Leber nicht befördernd einwirken, gleichviel, ob die Leber auf natürliche Weise wie bei der Schwangerschaft oder auf künstliche Weise wie durch Lebergift geschädigt wird. Sie wirkt erst dann günstig ein, wenn die Galle fast normal sezerniert zu werden beginnt.

SCHLUSSBETRACHTUNGEN.

Wenn ich meine Versuchsergebnisse kritisch betrachte, so kann wohl der Schluss gezogen werden, dass die Leberdiathermie beim Gallenblasen fistelhunde, wenn sie in schwächerer Intensität verwendet wird, nur ganz vorübergehende Vermehrung der Gallenmenge hervorruft. Die dabei bemerkbare temporäre Vermehrung des Bilirubins und der Gallensäure ist bloss als durch *vis a tergo* bewirkte Auspressung der Galle zu erklären.

Wenn man aber die Diathermie in noch stärkerer Dosis anwendet, so sind die Wirkungen derselben etwas verschieden. Die gesteigerte Sekretion der Galle dauert hierbei noch fort, nachdem die Diathermie schon ausgesetzt ist. Dies gilt nicht nur in bezug auf die Gallenmenge, sondern auch in bezug auf das Bilirubin und die Gallensäure. Die letzt genannten zwei Bestandteile der Galle sinken in ihrer Konzentration mit dem Eintritt der Choleresse etwas ab, aber da die Vermehrung der beiden Substanzen in viel geringerem Masse stattfindet, als die Zunahme der Gallenmenge, so folgt, dass die in einer Zeiteinheit sezernierte absolute Menge der Substanzen auffallend zunimmt. Diese Erscheinung ist nicht *vis a tergo* allein zu erklären. So darf wohl der Schluss gezogen werden, dass die Leberdiathermie, wenn sie in genügend grosser Dosis verwendet wird, sowohl auf die Gallenmenge als auch auf die Sekretion des Bilirubins sowie der Gallensäure befördernd einwirken kann.

Nun vergleiche ich die Ergebnisse meiner Versuche mit denen,

die in unserer Klinik mit vielen choleretischen Mitteln gewonnen wurden. In unserer Klinik wurde die choleretische Wirkung des Atophans und der Gallensäure von Sakamoto, und der Diuretika von Kubo eingehend untersucht. Sie kamen dabei zu dem Schluss, dass sogar die so kräftig wirkenden Choleretika wie Atophan oder Gallensäure keine vermehrte Sekretion des Bilirubins und der Gallensäure bewirken können; diese Choleretika rufen zwar mit dem Eintritt der Cholereise vermehrte Sekretion des Bilirubins und der Gallensäure hervor, doch kehrt die letztere, wenn die auf vis a tergo beruhende Auspressung der Galle zum Stillstand kommt, schnell zur Norm zurück, sogar bei der Fortdauer der gesteigerten Gallensekretion. So ist die choleretische Wirkung der Leberdiathermie von einer eigentümlichen Natur und mit keiner der hier untersuchten Choleretika zu vergleichen.

Was nun die Wirkungsweise der Leberdiathermie anbetrifft, so wird sie zur Zeit durch die vermehrte Durchblutung der Leber erklärt. Ob es in der Tat so ist, darüber kann ich noch nichts aussagen. Dass die choleretische Wirkung der Leberdiathermie durch vorherige Verabreichung von Atropin oder Adrenalin aufgehoben wird, spricht aber, meiner Meinung nach, wenigstens nicht gegen diese Erklärung. Adrenalin wirkt ja auf die Lebergefäße kontrahierend und Atropin auf die Gallengänge erschlaffend, was beides auf die Cholereise hemmend einwirken kann.

Es wurde noch weiter in meinen Versuchen festgestellt, dass die Leberdiathermie auf die Gallensekretion der pathologischen Leber nicht günstig einwirken kann. Erst in dem Stadium, wo die Gallensekretion fast normal vor sich zu gehen beginnt, wirkt sie befördernd ein. Aber hieraus einen Schluss zu ziehen, dass die Leberdiathermie am Krankenbette nutzlos wäre, ist damit noch nicht statthaft. Freilich ist, wie meine Versuchsergebnisse einwandfrei anzeigen, die Leberdiathermie auf die Gallensekretion der pathologischen Leber völlig wirkungslos, aber das sagt darüber nichts aus, ob die Diathermie auf die Erholung der pathologischen Leberzellen günstig einwirken könne oder nicht. Die Frage kann erst dann entschieden werden, nachdem die Wirkung der Leberdiathermie auf die übrigen Leberfunktionen erforscht ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Leberdiathermie in einer Dosis von 400–500 mA bewirkt beim Gallenblasen fistel Hunde nur eine geringe und vorübergehende Vermehrung der Gallenmenge.

2. Wenn die Dosis der Diathermie bis zu 1000–1500 mA vermehrt wird, so tritt ihre choleretische Wirkung deutlicher und mit Nachwirkung zu Tage. Hierbei vermehren sich das Bilirubin sowie die Gallensäure in der in einer Zeiteinheit sezernierten absoluten Menge, was lange Zeit nach dem Aussetzen der Diathermie fort dauert.

3. Es ist deshalb wohl der Schluss zu ziehen, dass die Leberdiathermie auf die Sekretion der Galle sowie deren Hauptbestandteile vermehrend einwirkt. Sie wirkt choleretisch im strengsten Sinne ein.

4. Atropin oder Adrenalin hebt die choleretische Wirkung der Diathermie auf.

5. Bei der pathologischen Leber wirkt die Diathermie, so lange die Leber stärker geschädigt ist, nicht choleretisch ein. Wenn die Gallensekretion fast bis zur Norm zurückkehrt, tritt erst die choleretische Wirkung der Leberdiathermie auf.

Zum Schlusse habe ich die angenehme Pflicht zu erfüllen, Herrn Prof. S. Nakagawa für seine Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

Bassler (1926): Ref. Zs. f. physikal. Ther. Ref., **33**, 163.

Budarin und Dragol (1930): Ebenda, Ref., **40**, 4.

Frisch (1928): Acta med. Scand., **69**, 241.

Frisch (1932): Kl. W., **11**, 725.

Goldgruber (1931): Ref. Zs. physik. Th. Ref., **42**, 70; (1932): Kl. W., **11**, 286.

Grube (1918): Med. Kl., **14**, 413.

Fujikawa (1932): Hokkaido-Igakuzasshi, **9**, Nr. 8 (Japanisch).

Hirsch (1925): M. m. W., **72**, 1029.

Iacono (1931): Ref. Zs. f. physik. Th. Ref., **42**, 99.

Kubo (1933): Hokkaido-Igakuzasshi, **11**, 2353 (Japanisch).

Kumekawa (1926): Zs. der Tokyo Medizinischen Gesellschaft, **40**, 805 (Japanisch).

- Karapetjan (1933): Zs. f. physik. Th., **43**, 279.
Kunioka (1932): Hokuetsu-Igakkazasshi, **47**, 323 (Japanisch).
Laqueur (1908): Zs. physik. Th., **22**, 243.
Mikami (1932): Diese Zs., **15**, No. 2.
Nakagawa and Fujikawa (1930): Diese Zs., **12**, Nr. 3.
Nagelschmidt (1909): M. m. W., **56**, 2575.
Oelsnitz (1933): Ref. Zs. physik. Th., **44**, 198.
Pagniez (1930): Ref. J. A. M. A., **86**, 393.
Sakamoto (1930): Hokkaido-Igakuzasshi, **8**, Nr. 11 (Japanisch).

POTENTIOMETRICAL STUDY ON CATALASE ACTION

By

RYOJI ITOH.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)*

(Received for publication, November 29, 1934)

It is usually assumed that catalase evolves inactive molecular oxygen from hydrogen peroxide, while peroxidase evolves rather active atomic oxygen. To produce evidence for this assumption by potentiometric study, a number of investigations were carried out in this laboratory. But the results were not compatible with the above idea. Namely, the purified peroxidase, prepared from *Eutrema wasabi* (a sort of horse-radish) or blood when acting on H_2O_2 , caused no rise of the oxidation potential indicating the evolution of active oxygen. The potential remained stationary at the level of H_2O_2 solution at a given H-ion concentration. The details of this experiment were already published by S. Kojima (1931) from this laboratory, and the mechanism of the peroxidase action was fully discussed by him.

Contrary to the peroxidase, the purified catalase, when added to a dilute H_2O_2 solution, revealed rather a higher oxidation potential against the inert electrode than did H_2O_2 alone. This is quite unexpected on the basis of the usual category of catalase action, the details of which will be given in this communication.

EXPERIMENTAL.

The Catalase used in this experiment was prepared by the method described by G. Kikuchi (1930). Namely horse red blood corpuscle was separated by centrifuge, washed thoroughly with isotonic saline solution so as to be free from any trace of serum and leucocyte and then submitted for hemolysis by the addition of water. On this solution the hemoglobin was completely precipitated by treating with chloroform and sodium chloride. The precipitate

was filtered off.

This raw enzyme preparation was purified further by being absorbed with aluminium hydroxide at pH 4.8 and diluting with *M*/15 sodium phosphate solution of pH 8.0. This solution was very active, showing $k(\text{reaction velocity constant}) = 410 \cdot 10^{-4}$. For the following experiment this catalase solution was diluted ten times with *M*/150 phosphate buffer (pH 6.8).

The reaction vessel consists of a cylinder glass flask of about 50 cc. capacity and was equipped with a cork stopper, which has five bores for the electrode, agar salt bridge, burette, air inlet and outlet. As the electrode metal, the platinum plate (1×1 cm.) was used and as reference electrode, the saturated KCl calomel electrode. As potentiometer, the unipivot type of Cambridge Instrument Company was used. The whole apparatus was immersed in the water bath kept at 20°C. Into the reaction vessel was introduced 10 cc. of the diluted catalase solution, air was bubbled through at a constant rate for the purpose of stirring. And the potential difference between both electrodes was measured every minute. When the potential showed a steady value a definite amount of dilute hydrogen peroxide solution (*M*/1200) was run down from burette, and the potential change was followed minute by minute. When this became steady, the next addition was made and so on. One of the typical experiments was illustrated in Figure 1.

It will be seen from this figure that the redox-potential shows a periodicity with a gradual increase of hydrogen peroxide (*a*), and that when the concentration of catalase was doubled, then the periodicity corresponding to the double concentration of hydrogen peroxide was obtained, being the height of the peak of the curve that remained constant (*b*). Of course, in the absence of catalase, when the catalase solution in the above experiment was simply replaced by the phosphate buffer solution, a flat curve was observed (*c*). Therefore, such a periodic phenomenon should be ascribed to the action of catalase. Another important point revealed in the above figure is the higher oxidation potential given by catalase solution at a certain concentration of hydrogen peroxide than that

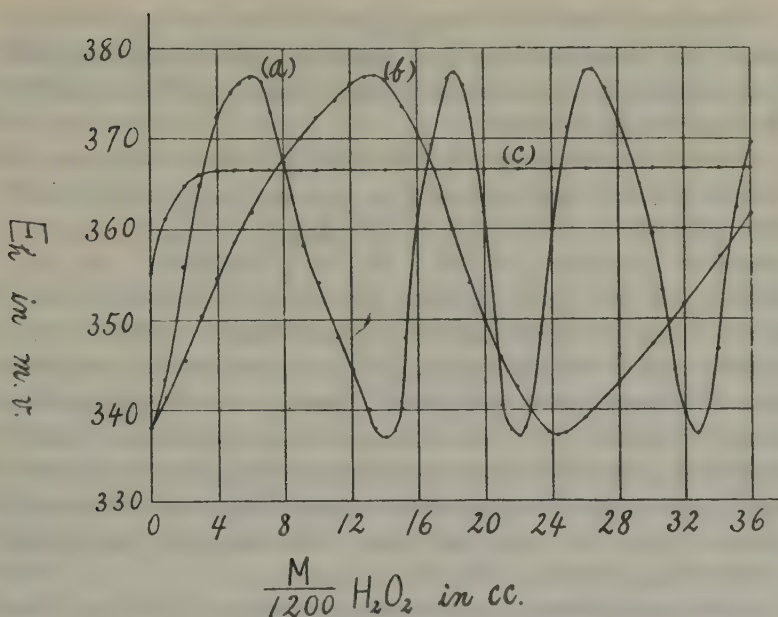


Fig. 1. The redoxpotential of the catalase action.

- (a) showing the curve with 10 times diluted catalase with $M/150$ phosphate buffer solution.
- (b) the same with 5 times diluted catalase.
- (c) $M/150$ phosphate buffer solution.

of hydrogen peroxide alone. This might be interpreted as due to the activation of hydrogen peroxide, in which we find the real nature of catalase action.

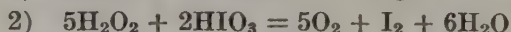
DISCUSSION.

It is a well known fact that hydrogen peroxide acts as oxidising and reducing agent. This is the reason why the redox-potential of hydrogen peroxide solution in any concentrations shows a constant value at a given pH. It may be said that the hydrogen peroxide acts as a buffer for the change of redox-potential. In other words, it behaves as a reducing agent for any substances of the higher oxidation potential and as oxidising for those of a lower one than its own.

These dual roles of hydrogen peroxide can be easily demonstrated. For instance, when it is added to the solution of ferric salt, it is partially converted into ferrous state; and when added to ferrous salt, to a ferric.

It should be acknowledged, therefore, that when a molecule of hydrogen peroxide was activated by catalase into a substance of higher oxidation potential this is immediately reduced by second molecule of hydrogen peroxide. But in a sufficiently low concentration of hydrogen peroxide against the concentration of catalase, nearly all of the molecules are activated and kept in this state for a certain length of time. The initial rise of the oxidation potential corresponds to this state. On the further addition of hydrogen peroxide this reduces the activated molecules accompanied by the evolution of molecular oxygen and shifts the potential toward such a state that the electrode stands simply in the catalase solution. The periodical phenomena of the potential change can be thus interpreted in a satisfactory manner.

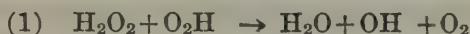
In this regard Bray's work (1921) is worthy of mention. He has reported an intimate relationship between the dual rôle of hydrogen peroxide as an oxidising and reducing agent and its decomposition by the catalysis of iodine. According to his opinion, iodine is first oxidised to iodic acid and this is then reduced to iodine, as is shown in the following equations:



Further he demonstrated that the evolution of molecular oxygen in the above reactions showed a periodicity at a certain pH.

The action of catalase, therefore, seems to stand in analogy with the rôle of iodine in the above reaction. But what a stereochemical configuration is asserted to this activated state of H_2O_2 molecule by catalase still remains a current topic of various investigators. The details on this subject are given fully in the monograph by H. v. Euler (1934). Here a few of the important contributions are quoted. F. Haber and R. Willstätter (1931) introduced a radical chain theory to explain the real chemismus

of catalase action. Namely, catalase activates the hydrogen atom of hydrogen peroxide and becomes itself desoxycatalase. The O_2H radical thus produced reacts with another molecule of H_2O_2 in the following manner, as is shown in (1); and further the OH radical again reacts with another molecule as in (2).



From this postulation the action of catalase seems to exist simply in the outbreak of reaction and is not involved in the further process of the decomposition of hydrogen peroxide. If this is really the case, the evolution of molecular oxygen should proceed in the absence of catalase surface as far as the chain proceeds. In order to prove this the author carried out an experiment, in which catalase reacted with hydrogen peroxide in one compartment which was separated from another containing only hydrogen peroxide solution by the collodion membrane permeable for H_2O_2 but not for the enzyme. If it may be assumed that the membrane is an freely permeable for the active radicals as hydrogen peroxide molecule, then the decomposition should occur in the compartment lacking catalase. But really we find no trace of the oxygen molecule evolved and also titrimetrically no decomposition of H_2O_2 . It should, therefore, be acknowledged that for the decomposition of hydrogen peroxide by catalase the presence of the active surface of the enzyme is absolutely indispensable in all phases of the decomposing process.

Quite recently, K. G. Stern (1932) advanced a theory that the H_2O_2 -molecule is activated by being split into two $-\text{OH}$ radicals by catalase. He arrived at this conclusion on the experimental evidence that catalase action was highly retarded by ethyl hydroperoxide ($\text{HO}-\text{OC}_2\text{H}_5$) and on the thermodynamic consideration that this mode of splitting requires less energy than that of Haber and Willstätter ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H} + \text{O}_2\text{H}$). But according to his calculation of the heat energy based on the data given by Urey (1929) and his coworkers to cause three possible types of dissociation, namely $\text{H}-\text{H}_2\text{O}$, $\text{HO}-\text{OH}$ and $\text{H}_2\text{O}-\text{O}$ 67, 49 and 35 Keal are

required respectively. Therefore, from the simple thermodynamic point of view, the last mentioned should be most probable. In this case the electronic configuration such as $\begin{array}{c} \text{H} \\ \text{H}:\ddot{\text{O}}::\ddot{\text{O}} \end{array}$ seems most

suitable. Though a number of reasons are raised against this configuration by various investigators, yet the conclusive evidence in favor of other types of the electronic configuration still seems lacking.

At any rate, from our present knowledge of the ultimate constitution of H_2O_2 -molecule we may be allowed to postulate that H_2O_2 may serve as oxydant in such a manner as $\text{H}_2\text{O} + \text{O}$ and as reductant as $2\text{H} + \text{O}_2$, and that presumably the catalase catalyses the former reaction.

The author is greatly indebted to Prof. K. Kodama for his kind criticisms and suggestions throughout this research.

REFERENCES.

- Bray (1921): J. Amer. Chem. Soc. L, 43, 1262.
 Euler (1934): Chemie d. Enzyme.
 Haber, F. & Willstätter (1931): Ber. d. dtsh. chem. Ges., 64, 2844.
 Kikuchi, G. (1930): Fukuoka Acta Medica., 23, No. 2, 103.
 Kojima, S. (1931): J. of Biochemistry, 14, 79.
 Stern, K. G. (1932): Z. für physiol. Chem., 209, 176.
 Urey, Wawsey und Rice (1929): J. Amer. Chem. Soc., 51, 1371.

ON THE ACID CHANGE IN SHED BLOOD.

(Studies on the blood pH estimated by the glass electrode. I)

By

HISATO YOSHIMURA.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)

(Received for publication, December 3, 1934)

GENERAL INTRODUCTION.

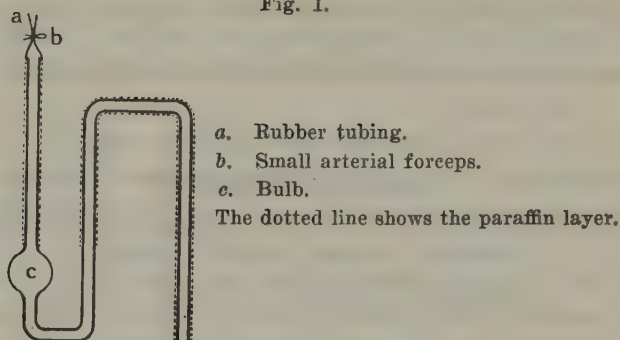
Since Kerridge (1925) adopted the glass electrode for the measurement of the blood pH, many investigators have adopted it for biological studies and have obtained satisfactory results. Its superiority to the hydrogen gas electrode or the quinhydrone electrode is that its electrode potential attains a stable equilibrium almost immediately after setting, so that errors due to the lapse of time before reading are satisfactorily excluded. Accordingly, it is suitable for determining the blood pH immediately after it has been shed, and also for studying the changes in the same for any desired duration.

Taking advantage of this superiority of the glass electrode method, I carried out some investigations on the blood pH, to which the question of the acid change in shed blood is related in this report.

REMARKS ON THE GLASS ELECTRODE METHOD.

The glass electrode used in the present investigation is sketched in Fig. 1. It is composed of an ordinary soft glass capillary tube of about 1 mm bore, including a bulb of about 1 cc. capacity, blown arbitrarily. The wall of this bulb serves as the electrode membrane. Its direct current resistance is ca. $1 \times 10^9 \Omega$, and its thickness is ca. 3×10^{-2} mm in its thinnest part. The electrode is filled with the solution to be determined, while the bulb is immersed in a standard buffer solution of known pH. Thus the electrode mem-

Fig. 1.



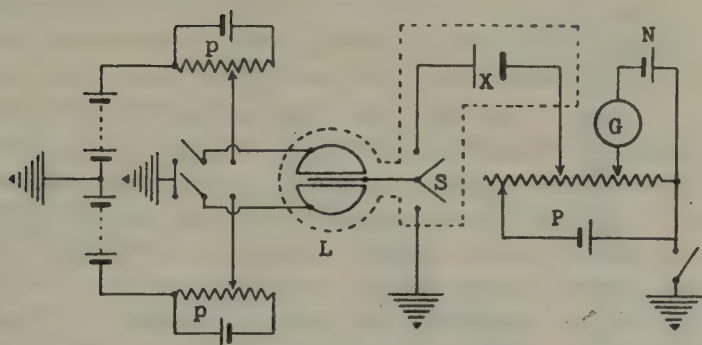
brane comes in contact with the solution in question, which is inside, and the standard one outside. For the latter, a phosphate buffer mixture of pH 6.9 or thereabout was adopted throughout the experiments, as the buffer capacity of the mixture is greatest at this pH.

For the null instrument, a Lindemann electrometer made by the Institute of Physical and Chemical Research, Tokyo, was used. Its sensibility is 1 millivolt per division. The arrangement of the potential measurement with this instrument is sketched in Fig. 2. It is almost the same as that adopted by Kerridge (1926), except the single pole change over switch for connecting the electrometer needle either with the glass electrode or with earth (*S* in Fig. 2). If an ordinary change over switch is used in this place, the needle will float when the connection is turned from earth to the electrode, and the measurement will lack precision. Therefore a new mercury switch was constructed which can connect the needle with the glass electrode before the earth circuit is cut off. To prevent the leakage of current, mercury reservoirs of this switch were dug on the tops of small ebonite piles, which were mounted on an ebonite plate. The switch was shielded completely by means of an earthed copper box.

The potential e thus measured is expressed by the well known Nerst formula,

$$e = e_g + 2.303 \frac{RT}{F} (\text{pH}_1 - \text{pH}_2) = e_g + \theta T (\text{pH}_1 - \text{pH}_2),$$

Fig. 2.



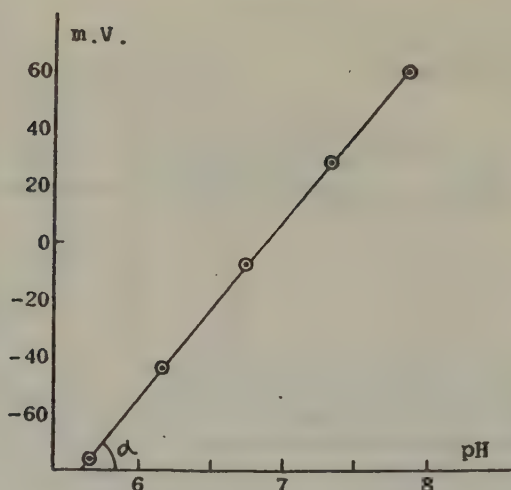
- L.* Lindemann electrometer.
X. Cell to be estimated.
S. Mercury change over switch.
G. Galvanometer.
P. Potentiometer for the pH-determination.
N. Cadmium standard cell.
p. Potentiometer.
 The dotted line indicates the shielding.

where pH_1 is the pH value of the inner solution of the electrode and pH_2 that of the outer one. e_g is the asymmetry potential of the glass electrode membrane; i.e., the potential which is established when both sides of the membrane are brought into contact with the same standard solution.

Test experiments were carried out with phosphate buffer mixtures and the following facts were observed:—The equilibrium of the electrode potential is attained within 1 or 2 minutes after the electrode has been mounted with the solution, and it remains constant for several hours, as was already known. But, if a solution of 16°C or so is put in the electrode, and the measurement is taken at 37°C , it is necessary to wait for ca. 5 minutes to attain the temperature equilibrium, which accompanies a constant potential.

Several phosphate buffer mixtures of different pH having been studied, the observed potentials were plotted against pH, previously determined by the ordinary hydrogen gas electrode method. The plot gave a straight line, an example of which is given in Fig. 3.

Fig. 3.



A potential-pH line at 37°C.

$\tan \alpha = \theta T = 61.46 \pm 0.46$

$e_g = -7.48 \pm 0.34$ m.V.

The slope of the straight line (Fig. 3), $\tan \alpha$ of which corresponds to θT of the Nernst formula, was calculated by the method of least squares and it was found that it coincided quite well with the theoretical value ($\theta T = 0.1983T$ or 61.5 at 37°C) of Nernst. Other determinations are seen in Table I, in which are given the mean values of the inclinations estimated 11–12 times on each of four glass electrodes examined for 40–46 days. Besides probable errors,

TABLE I.

No. of electrode	θT & its probable error	No. of exps.	D. C. resistance	Thickness of the thinnest part
1	57.17 ± 0.11	11	$1.1 \times 10^9 \Omega$	30 μ
2	57.01 ± 0.11	12	1.1 „	30 „
3	56.97 ± 0.15	11	1.2 „	33 „
4	55.83 ± 0.13	11	2.9 „	40 „

Theoretical $\theta T = 57.1\text{--}57.3$ (15–16°C)

the direct current resistance, and the thickness of the thinnest part of the electrode membranes are also given. As is shown in the table, the value of θT for a given electrode may be smaller than the theoretical one, but such an electrode can be used for practical purposes, as its value can easily be reproduced.

In Table II is given an example of diurnal variations of the asymmetry potential, e_g . The days noted on the table are those after the preparation of the electrode, which was kept in distilled water while it was not used. The experimental temperature was 15° – 16° C. The negative sign of the potential means that the potential of the inner surface is negative against that of the outer surface. We see that the range of its variation is small, so that it may be assumed to be a constant, if we are to follow the change of the blood pH for 12 or 24 hours, as was actually done in the following experiments. This assumption naturally introduces an error into the pH value computed from the observed electrode potential. The error is, however, only 0.02 pH or so in most cases, and does not go much beyond this. This should be borne in mind in discussing the results.

TABLE II.

Days	e_g (mV.)
2	-4.8
4	-7.0
5	-7.6
9	-9.4
13	-6.0
14	-6.7
21	-7.2
22	-8.8
23	-6.6
24	-6.9

When an electrode is to be used for practical determinations, the slope of its own potential-pH line must be determined at least once before use, with two buffer solutions of known pH, differing

markedly from each other; e.g., two phosphate mixtures of pH 5.60 and 8.00 respectively. In order to check a possible deviation of the asymmetry potential, the potential of the glass electrode should also be determined within a few hours before the measurements, with the buffer mixture of about the same pH as that of the solution in question; e.g., a phosphate buffer of pH 7.40 for determinations of the blood pH. The pH of these buffer solutions should, of course, be estimated accurately by the hydrogen gas electrode method.

A REVIEW OF STUDIES HITHERTO PUBLISHED ON THE ACID CHANGE IN SHED BLOOD.

Since Zuntz observed in 1868 that the carbon dioxide capacity of blood suffered a considerable reduction when it was allowed to stand after being shed, many researches enriched our knowledge of this phenomenon until at last Evans found in 1922 that it was caused by the acid change due to glycolysis. In those days, however, and later too, the pH of the whole blood could be measured only by the hydrogen gas electrode method, so that it was impossible to follow minutely the change in the pH of the blood with the lapse of time after being shed.

Having devised the glass electrode for use in biological research, Havard and Kerridge (1929) followed the acid change immediately after shedding by means of this electrode. They found that the acid change occurred in two stages and they called the first stage of the change "the first acid change." At 38°C, its extent was 0.05 pH on an average, and in duration lasted for 2-21 minutes, beginning within about 6 minutes after shedding. Then the change passed over the second stage which proceeded much more slowly than did the first. A typical course of the change is shown by the curve *k* in Fig. 4, cited from the author's own paper.

The fact that this first acid change occurs in the blood has a very important significance for blood pH determinations. As almost all pH values of the blood, reported up to that time, had been determined without knowledge of this acid change, they necessarily included an error due to this change; thus the values

reported for the normal blood should be to a certain extent lower than those of the real circulating blood.

According to Havard and Kerridge (1929), the second stage of the change is due to glycolysis as determined by Evans (1922), but the cause of the first acid change appears to be different, though no explanation has been found for it. What led them to this conclusion was that the first acid change could not be prevented in the blood by stopping glycolysis with NaF. They estimated the lactic acid contents of the blood by the help of Kay, once before the first acid change, and next after it, but found no significant difference between the two. They, however, noticed that the first acid change might be occasioned in the first sample during analysis, and it was therefore impossible to assert definitely that the acid causing the first acid change was not lactic.

Laug (1930) maintained that he was able to confirm the first acid change. With the quinhydrone electrode, he determined the pH values of two plasma samples, one of which was separated from the corpuscles immediately after being shed, while the other was separated after having been left for 10–15 minutes at 30°–35°C. It is uncertain, however, whether he could estimate the first acid change exactly. Recently, Dickinson, Havard and Platt (1932) pointed out that the first acid change observed by Havard and Kerridge (1929) might be due to an incomplete equilibration of temperature of the sample. Harris, Rubin and Shutt (1934) confirmed also the fact that the first acid change could not be observed when the temperature control was satisfactory.

EXPERIMENTS.

The aim of the present study is to examine the existence of the first acid change in question, the progress of the whole acid change in the shed blood for many hours, and also the effects of anticoagulants upon it.

The blood studied was that of the rabbit, the horse, and man. The human blood was collected from the cubital vein, the horse blood from the jugular vein, and the rabbit blood by heart puncture or by the following procedure: A glass cannula, 1 cm long

and 1.5 mm bore at its tip, was inserted into the carotid or femoral artery, or into the jugular vein. The cannula was connected with rubber tubing at its other end. The inner surfaces of the cannula and rubber tubing were coated with vaseline. After the cannula was full of blood, the rubber tubing was closed by means of a small arterial forceps. A syringe needle was inserted by puncturing the tubing and thus the blood was drawn into the syringe. By this procedure, samples could be collected very quickly. Contact of the blood with air was avoided by filling the empty space of the syringe and needle with physiological NaCl solution. The syringe with its needle was previously warmed in the physiological salt solution of the same temperature as that at which the measurements were to be taken. When an anticoagulant solution was added to the blood, it was put beforehand into the syringe, which contained a glass bead inside to help to bring about a quick mixing. Of course, the solution was previously warmed at the temperature of the measurement. The blood, thus collected in the syringe, was immediately transferred to the glass electrode. This was done by piercing the rubber cap on the top of the electrode (*a* in Fig. 1), and injecting the sample into the electrode tube. The portion of the blood which had run into the electrode first and had come into contact with air, was rejected from the other end of the electrode, so that the bulb of the electrode was filled with blood which suffered no loss of gaseous content.

RESULTS AND DISCUSSIONS.

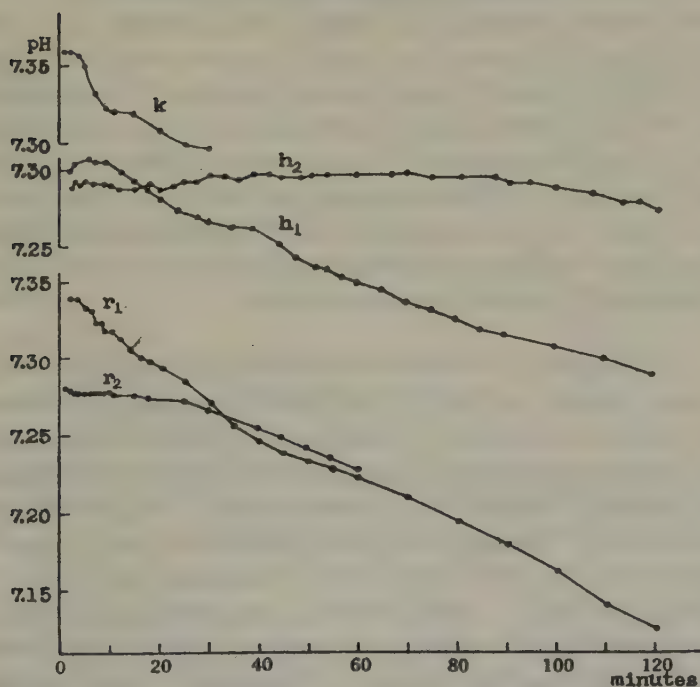
A. The first acid change.

I. Experiments without anticoagulants.

When the pH of the blood was measured repeatedly during the lapse of time after being shed, an acid change was found to begin sooner or later and to proceed further. Some examples are given in Fig. 4. Out of 22 experiments on rabbit blood without any anticoagulant at 37°C, although the acid change began at different times shedding (see Table III), in most cases (in 19 experiments), it began within ca. 10 minutes, rarely after ca. 30

Fig. 4.

Acid change in shed blood without anticoagulant at 37°C.



- k*. Typical first and second stages of the acid change cited from Havard and Kerridge's paper.
*h*₁ & *h*₂. Human blood.
*r*₁ & *r*₂. Rabbit blood.

minutes. The speed of the change also varied. No characteristic differences between the acid change in arterial blood and that in venous blood were found.

In Fig. 4 are given examples of acid change in rabbit blood (*r*₁, *r*₂) and human blood (*h*₁, *h*₂) observed at 37°C. The variety of the beginning and speed of the change can be recognized from *r*₁ and *r*₂, or *h*₁ and *h*₂. Especially remarkable is the difference between *h*₁ and *h*₂. In *h*₁, the acid change commenced ca. 10 minutes after shedding and proceeded rapidly with the lapse of time, while, in *h*₂, it began about 90 minutes after shedding and

its speed was much slower than in the case of h_1 .

Contrary to Havard and Kerridge's observations, no indications marking the first acid change were observed. In a few cases, it showed a tendency to dissociate into two stages as is seen in h_1 . But, in this curve, we see that the duration of the first stage of the change is much longer (ca. 30 minutes) than that of the first acid change as reported by those authors, and that the slope of the second stage is almost the same as that of the first one, so that the flexion of the curve after ca. 40 minutes had better be regarded as an accidental deviation from it, and not as the transition point of the first and the second stages.

II. *Experiments in which the glycolysis is stopped by NaF.*

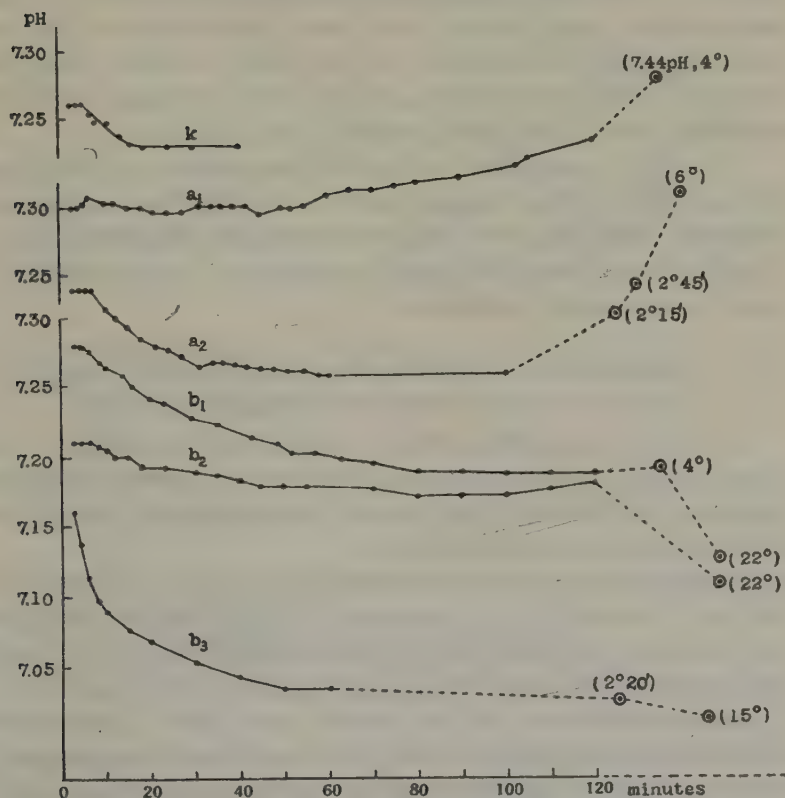
Rabbit blood:—As soon as the blood was drawn, NaF was quickly added in 0.03–0.03%* concentration to stop the glycolysis. In the cases where NaF was used in under 0.2% concentration, a certain amount of K-oxalate was added to it to supply the anti-coagulant action. An acid change was observed in every one of 11 experiments on rabbit blood at 37°C. Examples can be seen in b_1 , b_2 and b_3 in Fig. 5. After one hour, the acid change amounted to about 0.03–0.13 pH. Later, the progress of the change became very slow, and sometimes showed a temporary increase of pH, though a further acid change was found after 15–22 hours, when a slight hemolysis was noted.

In short, when rabbit blood is mixed with NaF, an acid change continues for many hours until a slight hemolysis takes place. According to Havard and Kerridge (1929) who observed mainly human blood at 38°C, the acid change due to glycolysis can be stopped by NaF, while the first acid change is not affected by it. In Fig. 5 k is cited from their paper to show their typical first acid change of blood mixed with NaF. The acid change observed by us seems to differ from their first acid change. Its

* According to Havard and Kerridge (1929), the addition of NaF in 0.02% is almost sufficient to prevent glycolysis. We generally used 0.06% or more.

Fig. 5.

Change in pH of the blood after shedding, of which the glycolysis is stopped by NaF.



k. Typical first acid change cited from Havard and Kerridge's paper.

a₁ & a₂. Human blood 9 + (0.6% NaF + 0.4% K-oxalate) 1.

b₁. Rabbit blood 9 + (0.5% NaF + 1.5% K-oxalate) 1.

b₂. " " + (2% NaF) 1.

b₃. " " + (2.5% NaF) 1.

long duration and its tendency to hemolysis suggest that this acid change may be due to an affection of the corpuscular membranes caused by NaF.

Human blood:—In one of the three experiments, in which

human blood was mixed with NaF in 0.06%, and K-oxalate in 0.04%, a similar acid change was observed. This is shown by a_2 in Fig. 5. The change began ca. 6 minutes after shedding and continued for about an hour, and then a slight alkaline change was noticed after ca. 2 hours. In the other two cases, the pH remained almost constant for an hour after shedding, and later an alkaline change took place gradually (Fig. 5, a_1).

In short, human blood, when NaF is added to it suffers an alkaline change rather than an acid one, showing no tendency to hemolysis. This supports the above mentioned suggestion, that the acid change due to NaF may be caused by the action of NaF upon the corpuscular membranes.

III. Experiments in which the blood was hemolysed completely by saponin and its glycolysis was stopped by NaF.

As soon as the rabbit blood was drawn, it was mixed with saponin in 0.5–1% concentration in order to bring about complete hemolysis, and also with NaF in 0.5% to stop glycolysis, and then its pH change was followed at 37°C.

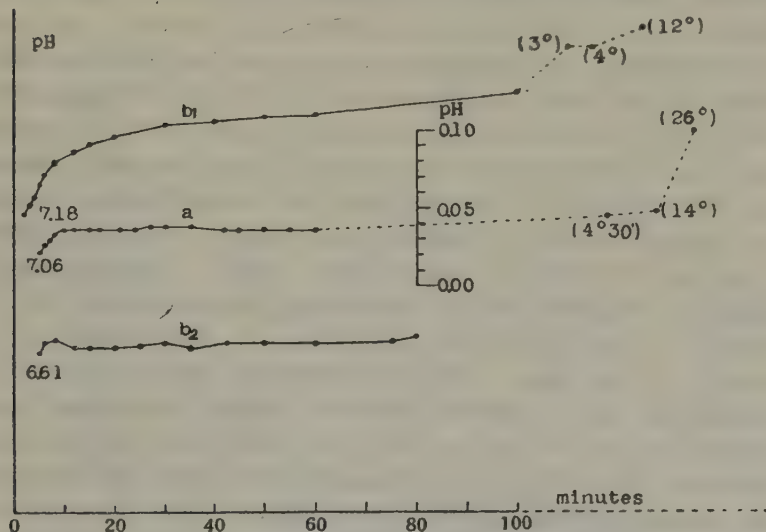
No acid change was found in six of the seven experiments (cf. Fig. 6, b_1 and b_2). In three cases, the pH remained constant (b_2), while in the other three, an alkaline change took place gradually (b_1), its extent being ca. 0.03–0.08 pH after one hour. In the remaining case, an acid change took place of which the extent was 0.03 pH after one hour, but it was found from measurements after 12 hours and 24 hours that the change had disappeared and the pH was restored to its original value.

Besides these cases, in one case where the concentration of NaF was 0.06%, the pH of the blood remained constant for one hour after shedding, but an acid change of 0.17 pH was found after 24 hours. This was probably due to the imperfect inhibition of glycolysis with so small an amount of NaF. From this fact, it is supposed that the acid change observed after a long time, when the concentration of NaF is insufficient, is, at least in part, due to imperfect inhibition of glycolysis.

Similar results were obtained with human blood. In two of

Fig. 6.

Change in pH of the blood after shedding, which is hemolysed by saponin and of which the glycolysis is stopped by NaF.



The relative position of each curve is taken arbitrarily. The pH value at its start is given by the figure.

a. Human blood 9 + (5% saponin + 5% NaF) 1.

b₁. Rabbit blood 9 + (5% saponin + 5% NaF) 1.

b₂. " " + (5% saponin + 5% NaF + 2% K-oxalate) 1.

the three experiments, an alkaline change was observed rather than an acid change (Fig. 6, a). In the remaining one experiment, the acid change occurred immediately after shedding, and continued for more than one hour, but an alkaline change was found to have occurred after 24 hours.

In short, if the corpuscular membranes are broken off by a hemolytic agent, and the glycolysis is stopped by NaF, the acid change does not take place for a long time, but an alkaline change tends to occur.

IV. Discussions.

From the above results, it is presumed that the acid change,

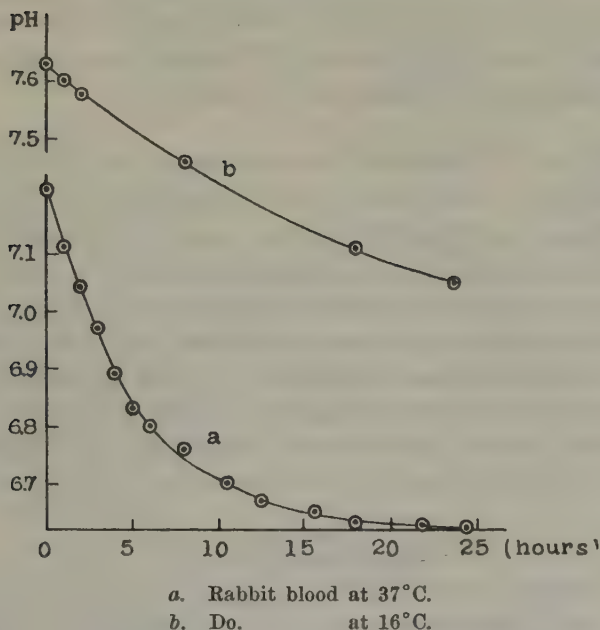
observed in the blood, the glycolysis of which is completely stopped by NaF, is mainly due to the affection of the corpuscular membranes. Its long duration explains it. It is certain from Hiraki's work that fluoride affects the corpuscular membranes in some way so as to cause hemolysis. An affection of the corpuscular membrane may cause the acid change in the blood by the shift of cell components, or by hemolysis in cases of severe affection. Therefore we cannot draw any conclusion as to the existence of the first acid change, not due to glycolysis, from the fact that the acid change occurs even in blood in which glycolysis is prevented. If the glycolysis is stopped by NaF in rabbit blood, which is simultaneously hemolysed completely in order to eliminate the acid change due to affection of the corpuscular membranes, no acid change is observable in most cases. This fact definitely confirms the above supposition. If no membrane affection occurs, it is expected that the acid change will be completely stopped, even in blood not hemolysed, when its glycolysis is completely stopped. In fact, the acid change could be stopped by NaF in two of the three experiments on human blood mentioned above, where it may be considered that the blood suffered little affection of its corpuscular membranes.

From the experimental results reported here, the following conclusion is reached: The acid change in shed blood does not occur in two stages as reported by Havard and Kerridge (1929). The so-called first acid change and the change during the later periods are one and the same process, of which the main cause is glycolysis. The fact ascertained by Havard and Kerridge (1929), that the first acid change did not occur in the plasma separated from the blood immediately after shedding, is understandable from the above conclusion.

B. The acid change of long duration.

On continuing to study the acid change minutely for 24 hours or so, it was observed that the change proceeded rapidly at first, and became slower later on. This is shown by *a* (at 37°C) and *b* (at 16°C) in Fig. 7. Evans (1922) confirmed the fact that the speed of glycolysis decreases gradually during one hour. *A.* and

Fig. 7.
Acid change of long duration in shed blood.



J. Roch (1927) stated that the speed of the pH change ran roughly parallel with that of glycolysis, though not strictly so, because of the buffer action of the blood. Therefore, the decrement of the acid change with the lapse of time is supposed to be due to the decrease of glycolysis.

C. Effect of temperature on the acid change.

It is noticed from our experiments that the lowering of temperature markedly decreases the acid change in shed blood. This had been already recognized by Havard and Kerridge (1929), Evans (1922) and many other investigators. As is indicated in Table III, the acid change in rabbit blood without anticoagulant commenced at 15–60 minutes after shedding at 16°C, while, in most cases, it began within ca. 10 minutes at 37°C. The extent of this acid change after one hour was 0.004–0.03 pH at 16°C, but

0.04–0.18 pH at 37°C. The same fact was found in comparing *a* and *b* of Fig. 7, which gives the pH-time curves of rabbit blood without anticoagulant at 37°C and 16°C respectively. Thus, the current view that a low temperature prevents the acid change of blood by inhibiting its glycolysis is confirmed.

D. Effects of anticoagulants on the acid change.

As evidence of their theory of blood coagulation, viz. that glycolysis acts as its motive, Stuber and Lang (1930) pointed out that anticoagulants such as citrate, oxalate, fluoride, hirudin and heparin depress the glycolysis of the blood. Evans (1922) and Macleod (1913) also recognized the depressing action of oxalate. The inhibition of glycolysis by NaF has already been described above. In this section, the effect of oxalate, citrate, hirudin and heparin upon the acid change in shed blood will be related.

TABLE III.
With rabbit blood.

Anticoagulant	Its concentration in the blood	Nos. of exps.	Temp.	Beginning of acid change (Time after shedding)	Extent of acid change at 1h after shedding (pH)
No anticoagulant	—		37°	1–10 min. (19 exps.)	0.04–0.18 (14 exps.)
K-oxalate	0.2%	3	„	17–36 „	0.004–0.06
Na-citrate	0.35%	2	„	17–33 „	0.04–0.09
Hirudin	0.025–0.05%	2	„	6–10 „	0.11–0.12
Heparin	0.05–0.1%	2	„	12–18 „	0.08–0.11
No anticoagulant	—	4	16°	15–60 min.	0.004–0.03
K-oxalate	0.2%	2	„	over 12 h	0.00
Na-citrate	1%	1	„	20 min.	0.02
Hirudin	0.005–0.015%	3		5–20 „	0.01–0.02

Experimental results.

Oxalate:—As is shown in Table III, when K-oxalate was added in the amount of 0.2% at 37°C, the acid change took place later

TABLE IV.
With horse blood at 16°C.

Anticoagulant	Its concentration in the blood	Nos. of exps.	Beginning of acid change (Time after shedding)	Extent of acid change at 16°C after shedding (pH)
No anticoagulant	—		ca. 10—over 150min. (7 exps.)	0.10–0.15 (2 exps.)
K-oxalate	0.5%	3	over 150 min.	0.02–0.05
Na-citrate	0.35%		60—over 150 min. (2 exps.)	0.04 1 exp.)

and its extent one hour after shedding was smaller than when no anticoagulant was employed. The acid change could be stopped by the addition of K-oxalate in the concentration for more than 12 hours at 16°C. Similar results were obtained in the case of horse blood at 16°C (cf. Table IV).

In short, oxalate depresses the glycolysis and lessens the acid change in shed blood.

Citrate:—As is shown in Table III, the addition of Na-citrate to rabbit blood at 37°C caused a delay in its acid change, though the extent of the change was not so markedly decreased. With horse blood at 16°C, a decrease in the extent of the change was observed at 16 hours (cf. Table IV), while with rabbit blood at 16°C, no such effect was seen.

In short, the acid change, and therefore the glycolysis, seems to suffer a slight depression by the addition of citrate.

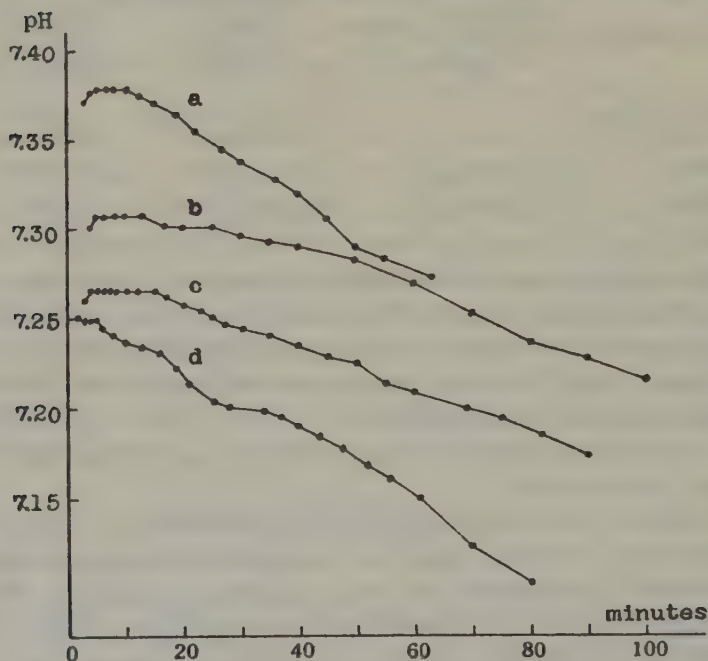
Hirudin and heparin:—As shown in Table III, no influence of these anticoagulants was observed on the acid change of rabbit blood both at 37° and 16°C. According to our results, therefore, hirudin and heparin have no power of depressing glycolysis.

Discussion.

In the above observations, we find a marked inhibition of the acid change, or of the glycolysis, in shed blood on the application of NaF, a similar inhibition but to a less extent with K-oxalate, only a slight sign of it with Na-citrate, and no effect with hirudin and heparin. In blood at 37°C, the acid change cannot be stopped

Fig. 8.

Acid change of rabbit blood at 37°C after shedding, of which the coagulation is stopped by an anticoagulant.



- a. Rabbit blood 9 + (1% heparin) 1.
 b. " " + (3.5% Na-citrate) 1.
 c. " " + (2% K-oxalate) 1.
 d. " " + (0.5% hirudin) 1.

completely with any anticoagulant except NaF (see Fig. 8), but, at 16°C, it can be stopped for many hours even with K-oxalate. NaF is, however, not a good anticoagulant because of its effect upon the corpuscular membranes, though it is useful for stopping glycolysis of the blood, regardless of any change in its pH. Therefore, in order to preserve a blood sample preventing coagulation and notable change in its pH for many hours, it is preferable to add K-oxalate in 0.2% to the blood; i.e., to add 2% K-oxalate solution in a proportion of 1:9 to the blood, and to keep it at 16°C or below. This fact has an important significance in the measure-

ment of the blood pH, which will be discussed in detail in the next report.

RÉSUMÉ.

1. A remarkable acid change occurs in the blood shortly after it has been shed. With regard to the course of the change, the existence of "the first acid change", reported by Havard and Kerridge, cannot be confirmed. Its whole course, including the so-called first and second stages, is regarded as being due to glycolysis.

2. The speed of the acid change in the blood decreases gradually during its course of many hours.

3. If the temperature of the blood is lowered, the commencement of the acid change is delayed, and its speed decreases.

4. NaF has a strong power to inhibit glycolysis, while, at the same time, it is apt to affect the corpuscular membranes and so bring about an acid change. K-oxalate can also depress the acid change due to glycolysis, though to a less extent than NaF. It stops the change completely for many hours after shedding, when used in a concentration of 0.2% with the sample in question kept at 16°C or below. Na-citrate has only a slight effect in depressing the acid change in shed blood, while hirudin and heparin exert no influence at all.

REFERENCES.

- Dickinson, Havard and Platt (1932): *J. Physiol.*, **78**, 28.
Evans (1922): *J. Physiol.*, **56**, 146.
Harris, Rubin and Shutt (1934): *J. Physiol.*, **81**, 147.
Havard and Kerridge (1929): *Biochem. J.*, **23**, 600.
Hiraki (1932): *J. Biochem.*, **15**, 331.
Kerridge (1925): *Biochem. J.*, **19**, 611.
Kerridge (1926): *J. Sci. Instr.*, **3**, 404.
Laug (1930): *J. Biol. Chem.*, **88**, 551.
Macleod (1913): *J. Biol. Chem.*, **16**, 497.
Roche, A. and J. (1927): *Compt. rend. Soc. Biol.*, **96**, 359.
Stuber and Lang (1930): *Physiol. u. Pathol. d. Blutgerinnung*, Berlin & Wien.
Zuntz (1868): *Beitr. z. Physiol. d. Blutes*, 25, Bonn.

RELATIONS BETWEEN THE OXYGEN-CAPACITY OF HAEMOGLOBIN AND ITS MOLECULAR STATE.

By

HIROSHI NAGAOKA.

*(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial
University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)*

(Received for publication, December 3, 1934)

INTRODUCTION.

Since the researches of Hardy (1899), it has become a general conception that the heat coagulation of proteins consists of two successive processes; first, denaturation, i.e. the change in the chemical structure of the protein molecules, and second, flocculation, i.e. the physical process of aggregating the molecules. Chick and Martin supported this view and maintained that the denaturation is a reaction of the protein molecules with water, and in order to distinguish the second process from denaturation, they called it by the term "agglutination". According to them, the heat coagulation of protein means its denaturation followed by flocculation. Lewis found that oxyhaemoglobin solution, when heated at 60.5°C, denatured with the minimum velocity at a pH of 6.76 at 37°C, i.e. the pH of "neutral" water at 37°C, and from this he concluded that the velocity reaches its minimum at the point where the concentration of hydrogen ion is equal to that of hydroxyl ion, assuming that the equality of ionic concentration still holds good even on heating. Lewis observed that the velocity of denaturation decreased when the solution contained neutral salts in high concentration. He regarded this as being due to the dehydrating action of the neutral salts upon the protein molecules, which led him to accept the opinion of Chick and Martin, viz. that the mechanism of denaturation consists of hydration of the protein molecules. Wu is of opinion that flocculation is a process which occurs after denaturation when the reaction of the solution is brought to the isoelectric region, the flocculated proteins redis-

solving in an acid or alkaline solution, while coagulation is an irreversible process taking place directly in the case of either natural or denatured protein under the influence of heating, alcohol, shaking, etc. He observed with Chen that the denaturation of proteins (egg-albumin, serum proteins and haemoglobin) brought about by immersing them in boiling water for 5–20 minutes, is accompanied by a decrease of H-ion concentration in an acid solution, but also by an increase in an alkaline solution, so that the acid- and base-binding power of the protein increases on denaturation. On coagulation, however, they observed just the opposite effect; that, near the isoelectric region of the protein, the denaturation is slower, as Lewis maintained, and they were of the opinion that, at the isoelectric point, no denaturation occurs, but only coagulation.

Iwata of our Institute found that the oxygen-capacity of haemoglobin is very sensitive against heat. On being heated at a temperature higher than the critical one, e.g. higher than 40°C for horse haemoglobin, the oxygen-capacity decreases irreversibly according to the monomolecular reaction. This is another fact pointing to the denaturation of haemoglobin, though it is not certain that it is identical with the denaturation treated by the above-mentioned authors.

Our first problem is to elucidate the relation between the denaturation of haemoglobin as indicated by the decrease in oxygen-capacity and its state of molecular aggregation as estimated by the colloid-osmotic pressure of the solution.

EXPERIMENTAL METHODS.

The haemoglobin solution: In order to simplify the conditions for causing heat denaturation, the haemoglobin was dissolved in an isotonic KCl-phosphate buffer solution of pH 6.7, the isoelectric point of haemoglobin. The buffer solution was prepared by mixing together 7 volumes of 0.171 mol KCl solution, 1.5 volumes of 0.1 mol KH_2PO_4 solution. Its pH was found to be 6.71 by glass electrode measurement, and its freezing point depression, $\Delta = -0.56^\circ\text{C}$ by the usual Beckmann method.

Corpuscles of defibrinated horse blood were thoroughly washed with the buffer solution mentioned. The corpuscular sediment was frozen and then thawed five times in succession. By this treatment the corpuscles were brought into perfect haemolysis, and the minute crystalline particles of haemoglobin formed a paste. This was stirred up with one-third of its volume of the buffer solution and then centrifuged to wash out any soluble impurities, and the supernatant solution was eliminated. This procedure was repeated 4 times, and then the sediment was dissolved in twice its volume of the buffer solution. This solution was then centrifuged and the supernatant portion collected. This is the haemoglobin solution with an isotonic salt content, at the pH of its isoelectric point.

Procedure in the experiments: 10–15 cc. of the haemoglobin solution prepared as mentioned above was put into each of the centrifuge tubes under liquid paraffin. The tubes were stoppered tightly to prevent evaporation, and then heated in a water bath of 55°C or 59°C. At various intervals during the heating, the tubes were taken out of the bath one by one, cooled and filtered or centrifuged to eliminate coagulum.

The solution thus freed from any coarse coagulum was then estimated as to its oxygen-capacity and its colloid-osmotic pressure, an unheated sample being taken as the control.

In order to estimate the oxygen-capacity, the solution was saturated with atmospheric air in a Petri's shell, and its oxygen-content was measured by means of Van Slyke's manometric apparatus.

The measurement of the colloid-osmotic pressure was carried out by Krogh-Nakazawa's method, somewhat modified by myself. A series of collodion caps, some 4 mm in bore and 22 mm long, were prepared, and their standard membrane potentials were measured. For this purpose, a 0.1 mol KCl solution was introduced into the cap, which was immersed in a 0.01 mol KCl solution. Then the potential difference taking place on the membrane was measured, each solution being led to a calomel electrode. In accordance with the results obtained by Aizawa, who studied the

properties of collodium membranes in Prof. Katsu's laboratory, those caps which had membrane potentials of 2.5–5 millivolts, were chosen for the experiments. With these, measurement of the colloid-osmotic pressure could be accomplished within 6 hours. A sample for measurement was put in a cap connected with a capillary tube which, in turn, was connected with a manometer, and a counter balance arrangement as described by Nakazawa. For the outer liquid, some 6 cc. of the same buffer solution without haemoglobin was employed. After about one hour, an equilibrium state was almost attained between the inner and the outer liquids, and a certain pressure was recorded. In most cases the pressure showed a slight increase after 2–3 hours and then a slight decrease, resulting in a stable value after 4–6 hours. If we take, however, the ratio of the pressure of the heated sample and that of the unheated one at each period, we find that it constitutes a good constant for the whole course of the above mentioned periods, in spite of the pressure showing a slight increase and decrease (See Table II–VI). Thus we took the mean of this ratio for the whole period, from which the change in the colloid-osmotic pressure of haemoglobin on heating was estimated.

For measurement of the absolute concentration of both intact and denatured haemoglobin, we estimated the Fe-content of the sample by Wong's method. The principle of this method is to detach Fe from the organic compounds by conc. sulphuric acid, the decomposition being facilitated with the aid of potassium persulphate. After the proteins have been eliminated with 10% sodium tungstic solution, Fe is deduced to iron-sulfocyanide and measured colorimetrically by comparing it with standard ferric ammonium sulphate solution.

EXPERIMENTAL RESULTS.

As a preliminary test, a haemoglobin solution was heated at 55°C for various periods, from 30 minutes up to 3 hours. The results are given in Table I, which shows that the colloid-osmotic pressure of the haemoglobin solution suffers a measurable decrease of only about 9% after 3 hours, when a certain amount of coagulum

is macroscopically visible.

Then another sample was heated at 55°C for 3 hours, and its oxygen-capacity, colloid-osmotic pressure and Fe-concentration were determined. The Fe-determination was carried out on the heated

TABLE I.
Haemoglobin solution heated at 55°C.

Time of heating	Macroscopic coagula	Colloid-osmotic pressure(mm H ₂ O)	Relative %	Loss caused by heating
Not heated (control)	—	58.0	100.0	—
30'	—	58.0	100.0	—
45'	—	58.0	100.0	—
1h 0'	—	58.5	100.9	—
1h 30'	—	57.5	99.1	0.9%
3h 0'	+	53.0	91.4	8.6%

Colloid-osmotic pressure were read after 24 hours.

Relative percentage means the percentage of the colloid-osmotic pressure against control.

sample, after its visible coagula had been filtered off through a filter paper for analysis. From the results given in Table II, we see that the colloid-osmotic pressure of the solution lost about 4.5% by heating, and the Fe-content of the filtrate lost about 3.1%. These two figures roughly coincide. On the contrary, the decrease

TABLE II.
Sample heated at 55°C for 3 hours.

	Control (not heated)				Sample (heated)				Relative %	Loss caused by heating
O ₂ -capacity	6.06 vol %				2.51 vol %				41.2	58.8%
Fe-content	3.69 mM (6.16 gm% Hb)				3.58 mM				96.9	3.1%
Colloid-osmotic pressure (mm H ₂ O)	t(hours)	0.5	1.5	2.5	4	6	9	24	95.5 (Means of ratios)	4.5%
	Control	151.1	163.8	165.2	164.4	163.1	162.2	160.8		
	Sample	144.2	156.0	158.0	156.2	156.8	154.0	153.7		
	Ratio	95.5	95.7	95.8	95.1	99.1	95.0	95.4		

in the oxygen-capacity by heating is far greater than in the other two. This loss was 58.8%. In other words, about 59% of the haemoglobin in the solution was denaturated by heating, but only about 3-4% of it aggregated to form coagulum, while the remaining portion underwent no change in the condition of its molecular aggregation. This proves that heat denaturation, defined by the loss of oxygen-combining ability, is quite a different process from aggregation, indicated by decrease in colloid-osmotic pressure, and also that, when aggregation of denaturated haemoglobin molecules takes place, most of them go to form a coarse coagulum, which may be filtered off by ordinary filter paper for analysis.

Similar experiments were repeated with heating at 59°C for half an hour, 2, 3 and 5 hours. In these experiments, the Fe-determination was performed after the solution had been freed from coagulum by centrifuging instead of filtration. The results are given in Tables III-VI. The experiment given in Table V was performed with a solution of 5.99 gm.% haemoglobin, while the other three were done with a solution of 6.89 gm.%. Such a difference in haemoglobin concentration, however, apparently exerted no influence on the results, and therefore these results are all summarized in Table VII. We see here, too, that the diminution of the oxygen-capacity far exceeds those of the colloid-osmotic pressure and of the Fe-content, showing that the denaturation of haemoglobin indicated by the decrease of its oxygen-combining

TABLE III.
Sample heated at 59°C for 30 minutes.

	Control (not heated)			Sample (heated)			Relative %
O ₂ -capacity	6.32 vol %			4.23 vol %			66.9
Fe-content	4.13 mM (6.89 gm% Hb)			4.02 mM			97.5
Colloid-osmotic pressure (mm H ₂ O)	t(hours)	1	3	4	6	48	95.5 (Means of ratios)
	Control	181.2	183.2	177.8	177.3	167.8	
	Sample	171.2	174.5	171.3	169.5	166.8	
	Ratio	94.5	95.3	96.6	95.6	99.4	

TABLE IV.
Sample heated at 59°C for 2 hours.

	Control (not heated)			Sample (heated)			Relative %
O ₂ -capacity	6.32 vol %			2.20 vol %			34.8
Fe-content	4.13 mM (6.89 gm% Hb)			2.76 mM			66.9
Colloid-osmotic pressure (mm H ₂ O)	t(hours)	1	2	4	6	48	64.8 (Means of ratios)
	Control	181.2	183.2	177.8	177.3	167.8	
	Sample	115.2	122.5	117.0	116.7	103.8	
	Ratio	63.6	66.9	65.8	63.0	61.9	

TABLE V.
Sample heated at 59°C for 3 hours.

	Control (not heated)				Sample (heated)			Relative %
O ₂ -capacity	5.16 vol %				1.02 vol %			19.7
Fe-content	3.59 mM (5.99 gm% Hb)				1.55 mM			43.1
Colloid-osmotic pressure (mm H ₂ O)	t(hours)	0.5	1.5	2.5	4	6	18	32.1 (Means of ratios)
	Control	142.2	148.2	151.0	150.7	147.3	147.5	
	Sample	30.2	47.2	49.5	47.5	47.3	47.7	
	Ratio	21.2	31.9	32.8	31.5	32.1	32.3	

TABLE VI.
Sample heated at 59°C for 5 hours.

	Control (not heated)			Sample (heated)			Relative %
O ₂ -capacity	6.32 vol %			1.02 vol %			10.9
Fe-content	4.13 mM (6.89 gm% Hb)			1.23 mM			29.7
Colloid-osmotic pressure (mm H ₂ O)	t(hours)	1	2	4	6	48	9.5 (Means of ratios)
	Control	181.2	183.2	177.8	177.3	167.8	
	Sample	17.0	17.7	16.7	17.0	11.0	
	Ratio	9.4	9.7	9.4	9.6	6.6	

TABLE VII.
Sample heated at 59°C.

Results of	Time of heating (hours)	Relative percentage of			Macroscopic coagula
		O ₂ -capacity	Colloid-osm. press.	Fe-content	
Control	Not heated	100.0	100.0	100.0	—
Table III	0.5	66.9	95.5	97.5	+
Table IV	2.0	34.8	64.8	66.9	+
Table V	3.0	19.7	32.1	43.1	+
Table VI	5.0	10.9	9.5	29.7	+

ability is quite different from, and goes in advance of, the aggregation of molecules.

In the former two cases, where the samples were heated for half an hour or two hours respectively, we see that the decrease in the colloid-osmotic pressure is very close to, but slightly exceeds,

TABLE VIII.

	Results of	Heating	Relative percentage of		
			O ₂ -capacity	Colloid-osmotic pressure	Fe-content
a	Table II	55°C, 3.0 hours	41.2	95.5	97.0
b	Table III	59°C, 0.5 hours	66.9	95.5	97.5
c	Table IV	59°C, 2.0 hours	34.8	64.8	66.9

that in the Fe-content. The same relation can be noticed in the results given in Table II. We understand this fact as follows: a number of denatured molecules aggregate together and the colloid-osmotic pressure is accordingly reduced. In most of these cases, aggregation proceeds to such a degree that coarse coagula, which can be filtered or centrifuged off from the solution, are formed. A small portion of them only join together to a less extent, so that they remain in the solution on centrifuging, and enter into the Fe-content of the solution. This is the reason why the relative percentage of the Fe-content is larger, though but slightly so, than that of the colloid-osmotic pressure.

In the latter two cases of Table VII, where heating was carried on for 3 and 5 hours respectively, the diminution of the oxygen-capacity, as was to be expected, goes ahead, but that of the colloid-osmotic pressure runs after it more speedily than that of the Fe-content, so that, in the last case, where the solution was heated for 5 hours, both the oxygen-capacity and the colloid-osmotic pressure of the solution diminished to about 1%, while the Fe-content still retained some 30%. At this stage we must surmise that all the denatured molecules, which covered about 90% of the total haemoglobin, underwent aggregation, of which the greater part, i. e. 70% of the total haemoglobin, precipitated forming coarse coagula, while the rest, i. e. 20% of the total haemoglobin, undergoing but slight aggregation, remained in the solution and entered into the Fe-content. Only 10% of the total haemoglobin was resistant against heat and suffered neither oxygen-combining ability nor aggregation, but served as the main factor of the colloid-osmotic pressure of the solution.

Now let us compare the results of Table II, when the solution was heated at 55°C for 3 hours, with those of Tables III and IV, when the solution was heated at 59°C for half an hour and two hours respectively. These are summarized in Table VIII, in which *a*, *b* and *c* represent the results of Tables II, III, and IV respectively. In *a* and *b* the colloid-osmotic pressure as well as the Fe-content of the solution decreased almost to the same extent, while the oxygen-capacity decreased further in *a* than in *b*. In *c* the oxygen-capacity is a little less than in *a*, while both the colloid-osmotic pressure and the Fe-content are much less in the former than in the latter. From this fact we can presume that, at a lower temperature (55°C), denaturation proceeds rather rapidly, while the molecular aggregation which follows it goes very slowly. At a higher temperature (59°C), the denaturation is of course accelerated to a certain extent, but the molecular aggregation is accelerated more markedly. This is another indication that denaturation is quite a different process from the molecular aggregation which follows it.

The experimental results mentioned above show that the de-

naturation of haemoglobin, defined by the decrease in its oxygen-combining ability, proceeds pretty rapidly at 55°C or 59°C, even when it is dissolved in a solution of its isoelectric pH. At first sight this seems to contradict Wu's statement mentioned in the introduction. It is, however, to be noticed that, in our experiments, we define heat denaturation of haemoglobin as loss of oxygen-combining ability, while Wu defined it as change in acid- and base-binding power, so that these two processes may not necessarily be the same. As is shown by our results, the diminution of the oxygen-capacity is a very sensitive indicator for the heat denaturation of haemoglobin.

SUMMARY.

1. Haemoglobin, dissolved in an isotonic phosphate buffer solution of pH 6.7, i. e. the isoelectric point of haemoglobin, was heated at 55°C or 59°C for various periods, and its heat denaturation as well as its molecular aggregation were studied. Denaturation was indicated by loss of the oxygen-capacity, while the molecular aggregation process was observed from the decrease in colloid-osmotic pressure, and also in the diminution of the Fe-content of the solution, from which the coagulated haemoglobin had been eliminated.

2. Denaturation is quite a different process from molecular aggregation, as the former proceeds much more rapidly than the latter. Both these processes may take place at the isoelectric point of haemoglobin.

3. At a lower temperature (55°C), a marked progress in denaturation is observed, while the molecular aggregation proceeds only to a slight extent.

4. On raising the temperature (59°C), the molecular aggregation is accelerated more rapidly than the denaturation so that the former may catch up after a certain duration of heating. Even at this stage, a certain portion of the aggregated haemoglobin does not form a coagulum eliminable by filtration or centrifuging.

CHEMICAL STUDIES OF THE PROTEINS OF FEEDING-STUFFS.

IV. The Comparison of Digestibility by the Proteolytic Enzyme Contained in Viscera of Eel.

By

TETUO TOMIYAMA.

(From the Imperial Fisheries Institute, Tokyo.)

(Received for publication, December 15, 1934)

The rate of liberation of amino acid and ammonia during digestion by a commercial trypsin has been reported in the preceding paper Tomiyama, T., Shigematsu, S. (1934). The present paper deals with the comparison of digestibility by the proteolytic enzyme contained in viscera of eel (*Anguilla japonicus*). The digestibility was determined by measuring the amino nitrogen and the soluble nitrogen yielded during the digestion.

The Preparation of the Enzyme:—The internal organs, including stomach, intestine, liver, free from connective tissues, were dehydrated by acetone and treated further with petroleum ether. The material thus obtained was powdered and extracted overnight with ten volumes of an equal mixture of *M*/5 phosphate buffer (pH 7.8) and glycerine. This was centrifuged, and the supernatant glycerine solution was used for the experiment.

A reaction system and reaction condition:—The optimum of the proteolytic enzyme in spleen of eel has been found by T. Oya (1927) to be at 37°C and a neutral reaction. Accordingly, several flasks which contained the following mixtures were kept in an incubator at 37°C.

	Main experiment	Protein control	Enzyme control
<i>M</i> /5 phosphate buffer (pH 7.3)	20 cc.	20 cc.	20cc.
Protein sample	1 g.	1 g.	—
Enzyme solution	5 cc.	—	5 cc.
Toluol	0.1 cc.	0.1 cc.	0.1 cc.
Glycerine + phosphate buffer	—	5 cc.	—

CHEMICAL STUDIES OF THE PROTEINS OF FEEDING-STUFFS.

IV. The Comparison of Digestibility by the Proteolytic Enzyme Contained in Viscera of Eel.

By

TETUO TOMIYAMA.

(From the Imperial Fisheries Institute, Tokyo.)

(Received for publication, December 15, 1934)

The rate of liberation of amino acid and ammonia during digestion by a commercial trypsin has been reported in the preceding paper Tomiyama, T., Shigematsu, S. (1934). The present paper deals with the comparison of digestibility by the proteolytic enzyme contained in viscera of eel (*Anguilla japonicus*). The digestibility was determined by measuring the amino nitrogen and the soluble nitrogen yielded during the digestion.

The Preparation of the Enzyme:—The internal organs, including stomach, intestine, liver, free from connective tissues, were dehydrated by acetone and treated further with petroleum ether. The material thus obtained was powdered and extracted overnight with ten volumes of an equal mixture of *M*/5 phosphate buffer (pH 7.8) and glycerine. This was centrifuged, and the supernatant glycerine solution was used for the experiment.

A reaction system and reaction condition:—The optimum of the proteolytic enzyme in spleen of eel has been found by T. Oya (1927) to be at 37°C and a neutral reaction. Accordingly, several flasks which contained the following mixtures were kept in an incubator at 37°C.

	Main experiment	Protein control	Enzyme control
<i>M</i> /5 phosphate buffer (pH 7.3)	20 cc.	20 cc.	20 cc.
Protein sample	1 g.	1 g.	—
Enzyme solution	5 cc.	—	5 cc.
Toluol	0.1 cc.	0.1 cc.	0.1 cc.
Glycerine + phosphate buffer	—	5 cc.	—

After each certain period, the reaction was stopped and at the same time the samples were deproteinized by adding a concentrated trichloroacetic acid solution sufficient to give a final concentration of three percent. The determination of amino nitrogen by Van Slyke's method and total nitrogen by Kjeldahl's method was run on the filtrate. The digested quantity was obtained by subtracting a protein control and an enzyme control from the main experiment.

EXPERIMENT RESULTS.

TABLE I.
Amino nitrogen in 4 cc. of the filtrate.

Protein sample Digestion period	Sardine	Silk-worm pupa	Soy bean
8	0.11	0.12	0.12
24	0.15	0.15	0.18
62	0.30	0.33	0.32
135	0.52	0.52	0.56
215	0.68	0.70	0.63

TABLE II.
Total nitrogen in 6 cc. of the filtrate (cc. *N*/45 NaOH)

Protein sample Digestion period	Sardine	Silk-worm pupa	Soy bean
8	0.30	0.80	1.10
24	0.80	2.10	2.20
62	2.10	4.30	8.20
95	3.38	5.73	8.80
135	5.80	7.75	10.75
215	10.70	11.40	15.55

It is clearly shown in Table I that the three proteins which have been subjected to digestion yield nearly the same quantity of amino nitrogen. However, as is given in Table II, an appreciable difference in the yield of the soluble nitrogen is observed between

the protein of soy bean and the others; namely, the former protein is easier to decompose into a soluble peptide than are the other two proteins.

The author is greatly indebted to Prof. Y. Okuda for advice during the experiment.

REFERENCES.

- Oya, T., Kawakami, M., and Suzuki (1927): Bull. Imp. Fish. Inst.,
3, No. 5.
Tomiyama, T. and Shigematsu, S. (1934): J. Biochem., 20, 131.

ON THE ANTIGENITY OF STARCH.

By

SHIRO FUJIMURA.

*(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University.
Directors Prof. S. Kakiuchi.)*

(Received for publication, Dec. 24, 1934)

I. INTRODUCTION.

The antigenity of a substance is usually ascertained in two ways. In the first place, when introduced parenterally, it must excite the organism to produce a corresponding antibody, which enters into the circulating blood plasma and can be detected by immunological reactions. In the second place the antigen must react against a corresponding antiserum in a specific manner. Hitherto it has been found that many substances, such as proteins, toxins and cells behave as antigen. They induce the antibody in the organism injected with them and react specifically against the antiserum.

Since the discovery of Forsman's antigen the number of observations have been increased and show that many substances of lipoid character can react specifically with a definite antiserum within the test tube, but that, alone they can not induce the antibody within the organism injected with them. Injected with a foreign serum, called a schlepper, however, they can induce the antibody. These substances are called Hapten.

That some polysaccharid compounds of bacterial origin can serve as hapten was found first by Docher and Avery (1917) in the case of type specific substance of pneumococcus; studied thoroughly by Zinsser and Parker (1922), Heidelberg and Avery (1923), and confirmed by Muller and Tomsik (1924) in the case of yeast; by Lancefield (1925) in the case of streptococcus viridans and by Landsteiner in the case of cholera (1927). Although any study of their structure is lacking entirely it is conceivable that these substances have a specific structure

among themselves and are entirely foreign to the animal organism. It is therefore not unlikely that they may behave as haptens.

It was quite strange to us, when Dr. Nodzu of the Immunochemical Institute (1926) reported that starch behaves as a true antigen and can induce the antibody formation within the animal organism when injected alone, even without schlepper.

According to Nodzu the starch of various origins has its own specificity and Nodzu reported that the origin of starch can easily be found immunologically. Professor Kakiuchi, however, doubted the specificity of starch of immensely various origins as reported by Nodzu and thought that the specificity shown by the experiment of Nodzu was not due to starch itself but was caused by a specific substance contained in starch as an impurity. I have therefore studied the antigenity of starch under the guidance of Professor Kakiuchi. The results of the experiments are given in the following sections.

II. IMMUNIZATION EXPERIMENT WITH MERCK'S SOLUBLE STARCH.

The immunization experiment with Merck's soluble starch was performed in the same manner as Nodzu's experiment.

1. *The method of immunization.*

5 cc. of 2% Merck's soluble starch in physiological salt solution were injected into the marginal ear vein of rabbits, the serum of which showed no complement fixation, for one week. After a five days' interval a second weekly injection was made. These weekly injections were repeated 4 times in all, with 5 days intervals between them. On the 5-7th day after the last injection, blood was taken out and used for the Browning test.

2. *The Browning complement fixation reaction.*

The immune serum obtained from rabbit treated with Merck's soluble starch was diluted with physiological salt solution and

used for the test. It may be allowed in passing to introduce here two new terms in immunological experiment. Many people are accustomed to call both substance, which induces antibody formation within an animal when injected in the animal, and the substance, which combines with the antibody in the test tube, antigen. However, as is stated in the introduction, a substance called half hapten only can react with the antibody within the test tube, while it does not induce any immunization in animals when injected alone or together with schlepper as pigserum. It seems us more rational to use the terms "antibody inducer" and "antibody detector." In the preceding section Merck's soluble starch was used as "antibody inducer" in the immunization experiment and to detect whether or not the antibody was formed by that immunization procedure the same Merck's soluble starch will be used as "antibody detector" in this Browning reaction.

The amount of Merck's soluble starch, which just fails to prevent the hemolysis of a hemolytic system containing two units of complement, was found to be 1 cc. of 1% solution. As antibody detector we put half of this amount of Merck's soluble starch into 0.5 cc. of 10 fold diluted immune serum and a varying amount of complement as 2, 4, 6, 8 units was added. As the unit of complement a minimum amount of guinea pig serum was taken, which hemolyses 0.5 cc. of 3% suspension of the sensitized ox red blood corpuscle completely. After the lapse of the 1.5 hour's stay in incubator at 37°C with occasional shakings, 0.5 cc. of the sensitized ox blood corpuscle was added and the mixture was put into the incubator for 1 hour and 15 minutes. The degree of hemolysis was then examined.

For each experiment the control experiments both for anti-serum-complement and antibody detector-complement were performed.

3. *The result.*

The result of the Browning complement fixation reaction stated above is shown in Table I. In the table, cases where no hemolysis occurred are noted as (—) and complete hemolysis is

shown as (#), while in intermediate cases signs as ($\pm$), (+) and ($\frac{+}{-}$) are used.

TABLE I.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement					Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6	8	10		
4	Merck's soluble starch	Merck's soluble starch	—	—	—	—	+	##	##
5	"	"	—	—	—	—	+	##	##
10	"	"	—	—	—	—	+	##	##
16	"	"	—	—	—	—	+	##	##
17	"	"	—	—	—	—	+	##	##
19	"	"	—	—	—	+	##	##	##

As can be seen from the table, Merck's soluble starch can act both as antibody inducer and as antibody detector. These findings coincide entirely with those of Dr. Nodzu.

III. THE IMMUNIZATION EXPERIMENT WITH PURIFIED SOLUBLE STARCH.

In the preceding experiment it was found that Merck's soluble starch may act both as antibody inducer and as antibody detector. However, it is necessary to note that Merck's soluble starch was not entirely pure and that it contained 0.0186% of nitrogen, and it is highly probable that these immunological characters were caused by some impurities contained in it.

We proceeded, therefore, to purify Merck's soluble starch.

1. Purification of soluble starch.

To remove nitrogenous impurities, starch solution was treated with trypsin. As, however, the trypsin used (Merck) showed amylolytic property, it was removed according to Willstätter's method as follows.

200 cc. of 1% trypsin (Merck) solution were added with 2.3 cc. of 1N acetic acid and mixed with 4.8 gm. of kaolin suspended into

200 cc. of water. The mixture was shaken well and centrifuged after half an hour. By this procedure trypsin was adsorbed on kaolin, while amylase remained within the solution. Trypsin was then eluted from kaolin with 200 cc. of ammonium phosphate solution, made of 114 cc. of 1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6 cc. of 1N, NH_4OH and 80 cc. of 87% glycerin, and dialysed for 12 hours. When such adsorption and elution were repeated a second time the trypsin solution obtained was found entirely free from amylolytic action, and was fully proteolytic.

Merck's soluble starch was digested with this purified trypsin at pH 8 for 6-7 hours and precipitated with the addition of the same amount of alcohol. The precipitate was then dissolved with hot water and precipitated again with alcohol. This dissolving and precipitating procedure was repeated several times and the finally obtained precipitate was dried and pulverized. The starch thus purified contained about 0.0041% nitrogen. The purified starch shows the same behavior against iodine and amylase as the original Merck's soluble starch.

2. Results of immunization.

The method of immunization with purified starch remained the same as in the preceding experiment. The complement fixation test was performed with the serum of the treated animal and the purified starch. The results are shown in Table II.

TABLE II.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement				Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6	8		
14	purified soluble starch	purified soluble starch	++	++	++	++	++	++
21	"	"	++	++	++	++	++	++
26	"	"	++	++	++	++	++	++

As is clear from the table there occurs almost no complement fixation. That the pure starch has neither antibody inducing

character nor antibody detecting action can be shown in complement fixation experiment between the impure soluble starch (Merck) antiserum and the purified starch (as detector) on the one hand, and between the purified starch antiserum and the impure Merck's starch (as detector) on the other, as is shown in Tables III and IV.

TABLE III.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement				Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6	8		
16	Merck's soluble starch	purified soluble starch	##	##	##	##	##	##
17	"	"	##	##	##	##	##	##
19	"	"	##	##	##	##	##	##
4	"	"	##	##	##	##	##	##
5	"	"	##	##	##	##	##	##
10	"	"	##	##	##	##	##	##

TABLE IV.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement				Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6	8		
14	purified soluble starch	Merck's soluble starch	##	##	##	##	##	##
21	"	"	##	##	##	##	##	##
26	"	"	##	##	##	##	##	##

IV. THE IMMUNIZATION EXPERIMENT WITH THE DIGESTED STARCH SOLUTION.

In the preceding sections we have seen that the purified starch lacks both antibody inducing property and antibody detecting action. That the antigenic character shown by the impure Merck's starch is not dependent on the starch itself, but depends on the impurity present can be proved as follows: One decomposes

impure starch which is active in antigenic character with amylase so far as iodine color reaction for starch entirely disappears in the mixture. If the mixture thus digested retains its antigenic character, it is certain that the starch itself has no concern with the antigenic character.

4% Merck's soluble starch solution was treated with the same amount of 0.4% amylase solution until the mixture showed no coloration with iodine added. The amylase was purified by Willstätter's method and lacked proteolytic action. The immune serum obtained by treatment with the digested mixture thus obtained was tested against the same digestion mixture as detector, the results of which are shown in Table V.

TABLE V.

No. of exp. serum	Antibody purified	Antibody detector	Units of complement					Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6	8	10		
101	digested starch solution	digested starch solution	—	—	—	—	+	##	##
103	"	"	—	—	—	—	—	##	##
105	"	"	—	—	—	+	+	##	##

As can be seen in the table, the digestion mixture showing no iodine starch reaction is as fully active as antigen. We must, however, be aware of the fact that the amylase which was used in digestion may contribute in complement fixation reaction. Therefore, the complement fixation test was performed with this immune serum with amylase solution as detector. The results shown in Table VI indicate clearly that this was also the case. As amylase ought to show no antibody detecting action against the impure Merck's original starch serum and as is proved by the experiment shown in Table VII, we proceeded to test the antibody detecting action of the digestion mixture against the impure Merck original starch serum and the result is shown in Table VIII.

As is clear from Table VIII, the digestion mixture still shows the antibody detecting property.

TABLE VI.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement			Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6		
101	digested starch solution	2% amylase solution	—	—	+	##	##
103	"	"	—	—	+	##	##
105	"	"	—	+	##	##	##

TABLE VII.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement			Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6		
16	Merck's soluble starch	amylase solution	##	##	##	##	##
17	"	"	##	##	##	##	##
18	"	"	##	##	##	##	##

TABLE VIII.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement					Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6	8	10		
16	Merck's soluble starch	digested starch solution	—	—	+	##	##	##	##
17	"	"	—	—	+	##	##	##	##
19	"	"	—	+	##	##	##	##	##

To complete the test the complement fixation reaction was performed with the serum obtained by treatment of digestion mixture against the impure Merck's starch as detector. As anticipated, the fixation reaction occurred here also very clearly. (See Table IX).

TABLE IX.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement					Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6	8	10		
101	digested starch solution	Merck's soluble starch	—	—	—	+	++	++	++
103	"	"	—	—	—	—	—	++	++
105	"	"	—	—	++	++	++	++	++

It is natural that the purified starch described in Section III showed no action as detector against the serum obtained by treatment with impure starch digestion product, as is shown in Table X.

TABLE X.

No. of exp. serum	Antibody inducer	Antibody detector	Units of complement				Antibody detector + complement	Antiserum + complement
			2	4	6	8		
101	digested starch solution	purified soluble starch	++	++	++	++	++	++
103	"	"	++	++	++	++	++	++

CONCLUSION.

The experiments described above give the following conclusions.

1. The impure Merck's soluble starch can act both as antibody inducer and as antibody detector.
2. The purified starch lacks both of these characteristics.
3. The starch digested to acromatic point for iodine test retains fully its character both as antibody inducer and as detector.
4. The antigenic character shown by impure Merck's starch is entirely independent of starch itself, and depends on the impurities contained in it.

I wish to express my most sincere thanks to Professor S. Kakiuchi for his kind advice and encouragement in carrying out the investigation.

REFERENCES.

- Avery and Morgan (1925): Journ. exp. Med., 42.
 Avery and Neill (1925): Journ. exp. Med., 24.
 Docher and Avery (1917): Journ. exp. Med., 26.
 Heidelberger and Avery (1923): Journ. exp. Med., 38.
 Heidelberger, Goebel and Avery (1925): Journ. exp. Med., 42.
 Heidelberger and Goebel (1925): Journ. exp. Med., 42.
 Lancefield (1925): Journ. exp. Med., 42.
 Landsteiner and Levine (1927): Journ. exp. Med., 47.
 Mueller (1926): Journ. exp. Med., 43.
 Mueller and Jomesik (1924): Journ. exp. Med., 40.
 Nodzu, K. (1926): Ikaijiho, No. 1740, 1744, 1747.
 Zinsser and Parker (1923): Journ. exp. Med., 37.

檢 印



Contents

No. 2, March, 1935.

WATANABE, Kaichiro. Die Glykogenie der Leber unter Einfluss von Adenylsäure, Cholsäure und sekundären Phosphat	197
WATANABE, Kaichiro. Einfluss der Gallensäure auf die Phosphorylierung der Adenylsäure (Adenylpyrophosphorsäurebildung) in der Leber und im Muskel	203
IWATO, Masata und WATANABE, Kaichiro. Vorkommen des Taurocholates in der Schlangen- und Katzengalle	211
KAWADA, Yutaka. Einfluss der Gallensäure auf die Ammoniakausfuhr im Harn	213
TUZIOKA, Shinsaku. Bedeutung der Gallensäure im Kalkstoffwechsel. X. Kalkausscheidung in Harn und Galle bei normalen sowie thyreoparathyreoprivem Hunde	219
WAKASUGI, Kanae. Durchblutungsversuche des Magens. V. Mitteilung. Über die Milchsäurebildung aus <i>d</i> -Alanin in der Magenwand	243
TSUTSUI, Tatsuhachiro. Durchblutungsversuche des Magens. VI. Mitteilung. Urikolytischer Prozess in der Magenwand	249
NAGAO, Tsuru. Durchblutungsversuche des Magen. VII. Mitteilung. Über die Vorgänge der Acetonkörperbildung in der Magenwand	259
MURAOKA, Shinobu. Durchblutungsversuche des Magens. VIII. Mitteilung. Über den Abbau des Arginins in der Magenwand	271
HONGO, Yoshiro. Durchblutungsversuche des Magens. IX. Mitteilung. Über das Kreatinproblem des Magens. I	279
X. Mitteilung. Über das Kreatinproblem des Magens. II	289
XI. Mitteilung. Über das Kreatinproblem in der Magenwand III	295
SUMIDA, Seiichi. Durchblutungsversuche des Magens. XII. Mitteilung. Über die Urease in der Magenwand. II	301
MITANI, Yoshio. Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss der Leber-Diathermie auf die Leberfunktion. I. Über den Einfluss der Leber-Diathermie auf die Gallensekretion	309
ITOH, Ryoji. Potentiometrical study on catalase action	329
YOSHIMURA, Hisato. On the acid change in shed blood. (Studies on the blood pH estimated by the glass electrode. I)	335
NAGAOKA, Hiroshi. Relations between the oxygen-capacity of haemoglobin and its molecular state	355
TOMIYAMA, Tetsuo. Chemical studies of the proteins of feedingstuff. IV. The comparison of digestibility by the proteolytic enzyme contained in viscera of eel	367
FUJIMURA, Shiro. On the antigenity of starch	371